



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Farmacologiche
Indirizzo Farmacologia Molecolare e Cellulare
XXVIII Ciclo

**Ruolo della morfologia e funzionalità mitocondriale
sulla distribuzione intracellulare dei mitocondri in neuroni
di *Drosophila***

Direttore della Scuola: Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d'indirizzo: Prof. Pietro Palatini

Supervisore interno: Prof. ssa Monica Montopoli

Supervisore esterno: Dott. Andrea Daga

Dottoranda: Tatiana Trevisan

INDICE

ABSTRACT	pag. 1
RIASSUNTO	pag. 3
INTRODUZIONE.....	pag. 5
1. <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COME ORGANISMO MODELLO	pag. 5
1.1. Vantaggi nell'uso di <i>Drosophila</i>	pag. 5
1.2. <i>Drosophila</i> come modello di patologie umane	pag. 6
1.3. Sistema UAS-GAL4	pag. 7
1.4. Il sistema nervoso in <i>Drosophila</i> : la giunzione neuromuscolare	pag. 8
2. I MITOCONDRI: ORGANELLI ESSENZIALI PER LA VITA DELLA CELLULA	pag. 10
2.1. Funzione dei mitocondri	pag. 12
2.2. La fosforilazione ossidativa	pag. 13
3. MORFOLOGIA E DINAMICITÀ MITOCONDRIALE	pag. 15
3.1. Meccanismo di fusione e fissione	pag. 18
3.2. Proteine coinvolte nel processo di fusione	pag. 19
3.2.1. Fzo1/Marf/Mfn1 e Mfn2	pag. 19
3.2.1.1. Mitofusina: sequenza, struttura e funzione	pag. 21
3.2.2. Mgm1p/Msp1p/Optic atrophy 1	pag. 23
3.3. Proteine coinvolte nel processo di fissione mitocondriale	pag. 26
3.3.1. Dnm1/Dlp1/Drp1	pag. 26
3.3.2. Fis1p/hFis1	pag. 28
3.3.3. Mff	pag. 28
3.3.4. MiD49 e MiD51	pag. 29
3.3.5. Gdp1	pag. 29
3.4. Meccanismo molecolare alla base della fusione mitocondriale	pag. 30
3.5. Meccanismo molecolare alla base della fissione mitocondriale	pag. 32
3.6. Dinamicità mitocondriale e patologie associate	pag. 34
3.6.1. Neuropatie di Charcot-Marie-Tooth	pag. 34
3.6.2. Atrofia Ottica Autosomica Dominante	pag. 35
3.6.3. DRP1 e morte cellulare dei neuroni	pag. 36
3.7. Dinamicità mitocondriale e trasporto mitocondriale assonale	pag. 37
3.7.1. Le proteine adattatrici regolano il trasporto mitocondriale ...	pag. 39
3.7.2. Trasporto mitocondriale e proteine di fusione	pag. 41
METODI	pag. 43

1. GENERAZIONE DI LINEE TRANSGENICHE	pag. 43
1.1. Generazione della linea ricombinante Marf RNAi, Drp1 ⁴⁴¹⁵⁵ RNAi	pag. 43
1.2. Generazione della linea UAS-Opa1 RNAi / SM6 ; UAS-Drp1 ⁴⁴¹⁵⁵ RNAi/TM3.....	pag. 44
2. BIOLOGIA CELLULARE	pag. 45
2.1. Semina delle cellule	pag. 45
2.2. Tecnica di trasfezione	pag. 46
3. MICROSCOPIA	pag. 46
3.1. Analisi immunostochimica (IHC)	pag. 46
3.2. Immunocitochimica (ICC)	pag. 48
3.3. Anticorpi	pag. 48
3.4. Software utilizzati per l'analisi delle immagini	pag. 49
3.5. Obiettivi per microscopio confocale	pag. 49
3.6. Analisi del trasporto mitocondriale lungo gli assoni di <i>Drosophila</i> con la tecnica del photobleaching	pag. 49
3.7. Preparazione di cervelli di larva per microscopia elettronica	pag. 50
4. TECNICHE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI	pag. 50
4.1. Co-immunoprecipitazione	pag. 50
4.2. SDS-PAGE	pag. 51
4.3. Western Blot (WB)	pag. 52
4.3.1. Rilevazione delle proteine	pag. 53
4.4. Respirazione mitocondriale	pag. 53
4.5. Dosaggi enzimatici	pag. 54
4.5.1. Attività del complesso I (CI)	pag. 55
4.5.2. Attività del complesso III (CIII)	pag. 55
4.5.3. Attività del complesso IV	pag. 56
4.5.4. Attività della citrato sintasi	pag. 56
4.6. Sintesi di ATP	pag. 57
4.7. Real Time PCR quantitativa (qRT-PCR)	pag. 57
4.7.1. Estrazione dell'RNA totale da larva	pag. 57
MATERIALI	pag. 61
1. Soluzioni utilizzate	pag. 61
2. Linee cellulari	pag. 64
3. Linee di <i>Drosophila</i>	pag. 64
RISULTATI	pag. 65

1. Analisi della morfologia mitocondriale nel corpo cellulare di neuroni e negli assoni di <i>Drosophila</i>	pag. 65
2. Analisi della distribuzione mitocondriale lungo l'assone	pag. 71
3. Analisi della distribuzione mitocondriale nella giunzione neuromuscolare.....	pag. 76
4. Traffico mitocondriale	pag. 80
5. Funzione mitocondriale	pag. 84
DISCUSSIONE	pag. 91
BIBLIOGRAFIA	pag. 95

ABSTRACT

Mitochondria are the energy producing organelles in eukaryotic cells providing ATP through oxidative phosphorylation (OXPHOS). Mitochondria are highly dynamic and undergo fission, fusion and move into the cell along the microtubules to generate the mitochondrial network. Mitochondrial dynamics play a critical role in the control of organelle shape, size, number, function and quality control of mitochondria. It is regulated by several GTPases that play an important role in fusion and fission processes. In mammals, mitochondrial fusion is controlled by Mitofusin 1 (Mfn1), Mitofusin 2 (Mfn2) and Optic atrophy protein 1 (Opa1), while mitochondrial fission is regulated by Dynamin related protein 1 (Drp1).

The aim of this study is to understand how mitochondrial distribution in neuronal cells is affected by mitochondria function and/or morphology. We use *Drosophila melanogaster*, whose genome contains homologs for all mitochondrial fusion and fission proteins, as a model organism to study how loss of fusion and fission protein modify the axonal distribution and motility of mitochondria. We demonstrate that loss of Marf (Mitochondrial associated regulatory factor, homologous to human mitofusins) or Opa1 causes an accumulation of mitochondria in the soma, a defect in the axonal distribution of mitochondria, a severe depletion of mitochondria in neuromuscular junctions (NMJs) and reduced mitochondrial motility. Simultaneous loss of Drp1 rescues the Opa1 phenotype very robustly while loss of Marf essentially does not. Viability data however show the opposite trend. The expression of Marf RNAi or Opa1 RNAi cause lethality, and so does the double down regulation of Opa1 and Drp1. Conversely individuals expressing Marf RNAi and Drp1 RNAi simultaneously survive and are comparable to the controls. We then examined possible alterations of mitochondrial function by analyzing the mitochondrial respiratory capacity, the activity of the respiratory chain complexes and ATP production capacity. The data show that individuals where Marf, Opa1 or simultaneously Opa1 and Drp1 are down-regulated display severe alterations in mitochondrial function, while there are no obvious energy defects in individuals in which the expression of Marf and Drp1 is simultaneously reduced.

Collectively our results obtained suggest that mitochondrial morphology is important for a homogeneous distribution of mitochondria along the axon and their transport to synapses and that these mechanisms are independent of mitochondria function.

RIASSUNTO

I mitocondri sono organelli essenziali per la cellula e la loro funzione primaria è di produrre energia sottoforma di ATP. I mitocondri sono organelli altamente dinamici; processi di fusione e fissione delle membrane mitocondriali ne controllano la forma, la lunghezza e il numero e un equilibrio tra i due meccanismi è fondamentale per una corretta morfologia mitocondriale. Numerose proteine sono coinvolte nei processi di fusione e fissione mitocondriale: Mitofusina 1 e Mitofusina 2 (Mfn1 e Mfn2) e Optic atrophy 1 (Opa1) regolano i processi di fusione mitocondriale, mentre Dynamin-related protein 1 (Drp1) media la fissione.

Drosophila possiede il gene mitochondrial assembly regulatory factor (MARF), espresso in modo ubiquitario ed omologo al gene MFN2. Nel tessuto muscolare la riduzione di espressione di Marf induce frammentazione e alterazione della morfologia del mitocondrio. Inoltre, mutanti di Marf mostrano una severa deplezione dei mitocondri nelle giunzioni neuromuscolari (NMJs) ed un'alterazione della morfologia della giunzione caratterizzata dall'aumento nel numero e da una riduzione nella dimensione dei bottoni sinaptici.

Un altro aspetto della dinamica mitocondriale, oltre ai processi di fusione e fissione, è la motilità dei mitocondri, che deve essere altamente regolata soprattutto in cellule come i neuroni. Il trasporto mitocondriale e la continua ridistribuzione dei mitocondri lungo l'assone è essenziale per il mantenimento dell'integrità assonale e delle normali funzioni della cellula. Studi hanno messo in evidenza come la mancanza di mitocondri a livello delle giunzioni neuromuscolari in *Drosophila* comprometta la trasmissione sinaptica e come difetti nel trasporto mitocondriale assonale siano implicati nello sviluppo di disordini neurologici e malattie neurodegenerative (Chan, 2006).

Lo scopo di questo lavoro è quello di capire il ruolo della morfologia e della funzione mitocondriale nella distribuzione intracellulare dei mitocondri nei neuroni. Per fare questo abbiamo utilizzato *Drosophila melanogaster*, organismo modello efficace per l'analisi della funzione genica, inclusa quella di geni responsabili di patologie umane. L'analisi della morfologia mitocondriale è stata effettuata utilizzando linee di *Drosophila* che esprimono in vivo un transgene per RNA interference e che permette di ridurre l'espressione di geni endogeni coinvolti nei processi di fusione e fissione mitocondriale, quali Marf, Opa1 e Drp1. Abbiamo inoltre creato linee che esprimono contemporaneamente i transgeni per RNAi di Marf e Drp1 o Opa1 e Drp1, con lo scopo di bilanciare i meccanismi di fusione e/o fissione. Ci siamo soffermati in particolare sullo

studio di due aspetti principali, la morfologia e la funzionalità mitocondriale, per capire se difetti nella morfologia e nella funzionalità mitocondriale siano collegate e concorrano insieme allo sviluppo di patologie. Numerose patologie neurodegenerative sono infatti caratterizzate da alterazioni del trasporto mitocondriale e spesso questo è associato a difetti nella morfologia e nella funzionalità mitocondriale. Per studiare la morfologia mitocondriale, le linee UAS-RNAi sono state incrociate con una linea che contiene il promotore ELAV per l'espressione tessuto-specifica nei neuroni ed esprime una GFP mitocondriale. Abbiamo analizzato la morfologia dei mitocondri, sia nel corpo cellulare sia negli assoni e la distribuzione mitocondriale in assoni lunghi come i motoneuroni e assoni corti come quelli del nervo ottico e la distribuzione mitocondriale nella giunzione neuromuscolare. I risultati ottenuti mostrano che frammentazione dei mitocondri e alterazione della distribuzione mitocondriale assonale in individui in cui sia ridotta l'espressione di proteine di fusione. Inoltre si osserva una diminuzione della percentuale dei mitocondri mobili e del numero assoluto dei mitocondri anterogradi e retrogradi. Questi dati dimostrano che vi è una stretta correlazione tra morfologia mitocondriale e distribuzione dei mitocondri, in particolare in assoni lunghi. Inoltre analizzando le linee Marf RNAi Drp1 RNAi e Opa1 RNAi Drp1 RNAi, nelle quali gli eventi di fusione e fissione ridotti ma sono in equilibrio tra loro, si osserva un miglioramento la morfologia, la distribuzione e il trasporto mitocondriale assonale in modo particolare nel caso di Opa1 e non nel caso di Marf.

Abbiamo cercato di capire quindi se in questi individui vi fossero alterazioni delle funzionalità mitocondriali attraverso l'analisi della capacità respiratoria mitocondriale, dell'attività dei complessi della catena respiratoria e della capacità di produzione di ATP. I risultati ottenuti dimostrano che morfologia e funzionalità mitocondriale non sempre sono collegate tra loro hanno effetti diversi nella modulazione della distribuzione mitocondriale assonale. In conclusione possiamo affermare che solamente la morfologia e la dimensione del mitocondrio sembrano essere essenziali per la corretta distribuzione mitocondriale assonale.

INTRODUZIONE

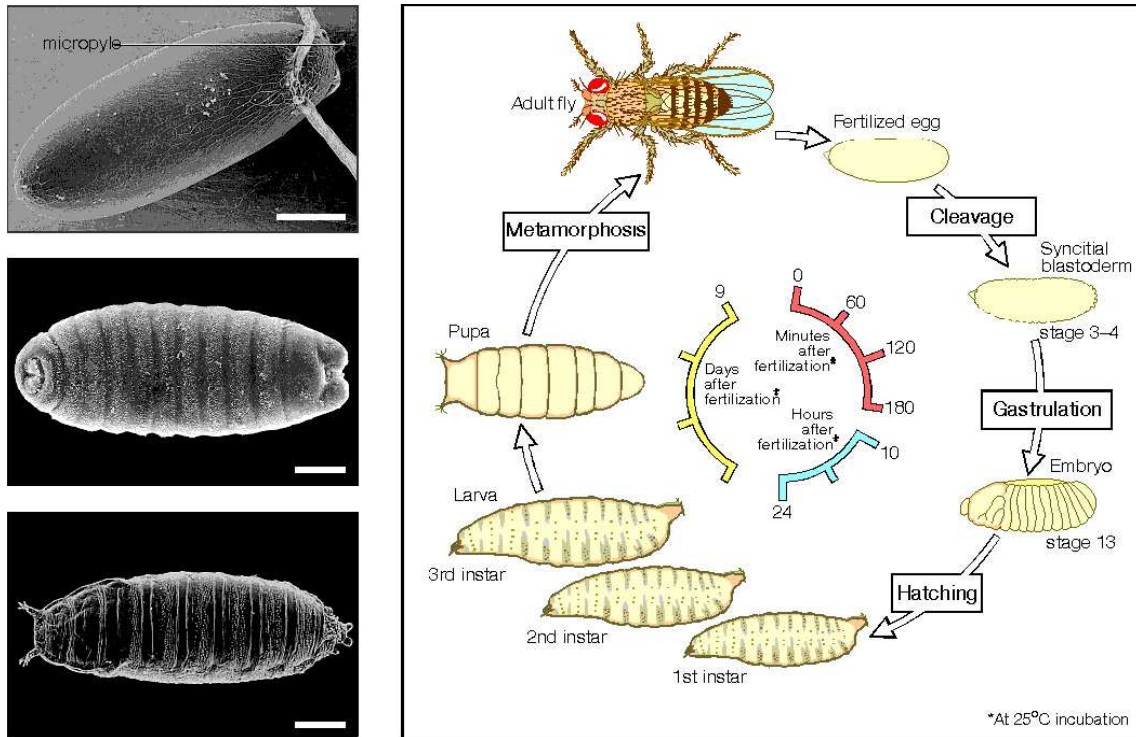
1. DROSOPHILA MELANOGASTER COME ORGANISMO MODELLO

Drosophila melanogaster rappresenta un modello efficace per l'analisi della funzione genica, inclusa quella di geni responsabili di patologie umane. Sebbene lontani filogeneticamente e chiaramente diversi morfologicamente, l'uomo e *Drosophila* sono molto simili a livello genetico e condividono una gran parte dei meccanismi molecolari di base, come per esempio quelli coinvolti nello sviluppo e nei processi di proliferazione cellulare.

I geni che controllano queste vie di trasduzione del segnale sono altamente conservati e ciò fa capire il potenziale ruolo di *Drosophila* come modello per lo studio di patologie umane. Nel 2001 sono stati comparati tra loro 929 prodotti genici umani coinvolti in patologie con il genoma di *Drosophila* (Reiter, 2001). Lo studio ha rivelato che circa il 75% di geni patologici umani possiede un gene corrispondente, con elevato grado di omologia di sequenza proteica, in *Drosophila*.

1.1. Vantaggi nell'uso di *Drosophila*

Oltre all'elevata conservazione delle sequenze proteiche e dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo, *Drosophila* presenta anche numerosi vantaggi sperimentali. Ha un ciclo vitale breve, di circa 10 giorni, composto da quattro fasi principali: una prima parte in cui le uova depositate dai moscerini fecondati si schiudono dando origine ad embrioni, una seconda definita larvale nella quale l'embrione passa dal primo stadio al terzo con crescita e sviluppo dei vari organi interni, ed infine la fase di pupa che evolve nell'individuo adulto in seguito al processo di metamorfosi in cui si sviluppano occhi, antenne, ali, zampe, genitali, ecc. (Fig. 1). Inoltre l'utilizzo di *Drosophila* presenta costi di mantenimento bassi se comparato con altri modelli animali, è di piccole dimensioni, facile da gestire e permette di ottenere un alto numero di individui che possono essere usati per successivi 'screening' genetici.



*Fig. 1: Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*. Pannello a sinistra: immagini, ottenute al microscopio elettronico a scansione (SEM), dei tre stadi principali di sviluppo di *Drosophila* (stadio embrionale, larvale e di pupa); pannello a destra: schema raffigurante l'intero ciclo vitale in cui si mettono in evidenza gli stadi in modo dettagliato e le tempistiche di sviluppo. Scala: 100 μm [a].*

Se si altera l'espressione di geni umani in *Drosophila*, si possono ottenere fenotipi chiaramente visibili come alterazioni della struttura dell'occhio o malformazioni delle ali che possono essere sfruttati, insieme agli strumenti genetici sviluppati nel corso degli anni, per l'identificazione di pathways coinvolti in una determinata patologia.

1.2. *Drosophila* come modello di patologie umane

Per la creazione di modelli di patologie umane vengono utilizzati per *Drosophila melanogaster* due principali approcci genetici: forward-genetic e reverse-genetic. La tecnica di "forward-genetic" consiste nel mutagenizzare geni o utilizzare elementi trasponibili al fine di generare un elevato numero di mutanti che verranno successivamente 'screenati' per individuare un fenotipo collegabile alla patologia. I prodotti genici identificati in *Drosophila* omologhi a quelli umani sono infatti spesso coinvolti in diverse patologie, tra qui le malattie neurodegenerative (Barinaga, 1999).

Nel caso in cui, invece, il gene responsabile della malattia sia noto l'approccio che si segue è quello di "reverse genetics". In questo caso si verifica l'esistenza di un gene omologo in *Drosophila* che essendo un modello sperimentale duttile permette di studiarne la funzione applicando per esempio strategie che portano ad un aumento o riduzione del gene d'interesse. Quest'ultimo approccio è stato recentemente facilitato dallo sviluppo di librerie di linee transgeniche come per esempio VDRC (Vienna *Drosophila* RNAi Center) che raccoglie linee di *Drosophila* in grado di produrre RNA interference genici essenzialmente per tutti i geni identificati nel genoma di *Drosophila*.

1.3. Sistema UAS-GAL4

Il sistema UAS-GAL4 (Brand, 1993) è un sistema binario di espressione ampiamente utilizzato in *Drosophila* per esprimere transgeni in modo controllato nel tempo e nello spazio. In questo modo si può indurre sia sovraespressione della proteina codificata dal transgene sia perdita di funzione genica in seguito ad espressione di costrutti per RNA interference. La proteina Gal4 è un attivatore trascrizionale di lievito che lega sequenze UAS (Upstream Activating Sequence) attivando l'espressione del gene a valle di tale sequenza. La caratteristica fondamentale di questo sistema è che il gene GAL4 e il gene target preceduto dalla sequenza UAS si trovano in due linee transgeniche diverse: nella linea GAL4 è presente un promotore che ne permette espressione in cellule e tessuti specifici, mentre nella linea UAS è presente il gene d'interesse che però risulta silente. Solo nel momento in cui le due linee vengono incrociate, nella progenie, la proteina Gal4 sarà in grado di legare la sequenza UAS e permettere così l'espressione genica (Fig. 2). Uno dei vantaggi principali rispetto ai sistemi precedentemente utilizzati è la possibilità di esprimere in modo tessuto-specifico geni che altrimenti risulterebbero tossici se espressi ubiquitariamente.

Sfruttando questa tecnica sono state ottenute numerose linee GAL4 e UAS-target gene che sono state utilizzate per lo studio funzionale di geni espressi in *Drosophila* nelle diverse fasi dello sviluppo dell'organismo, dall'embrione all'individuo adulto.

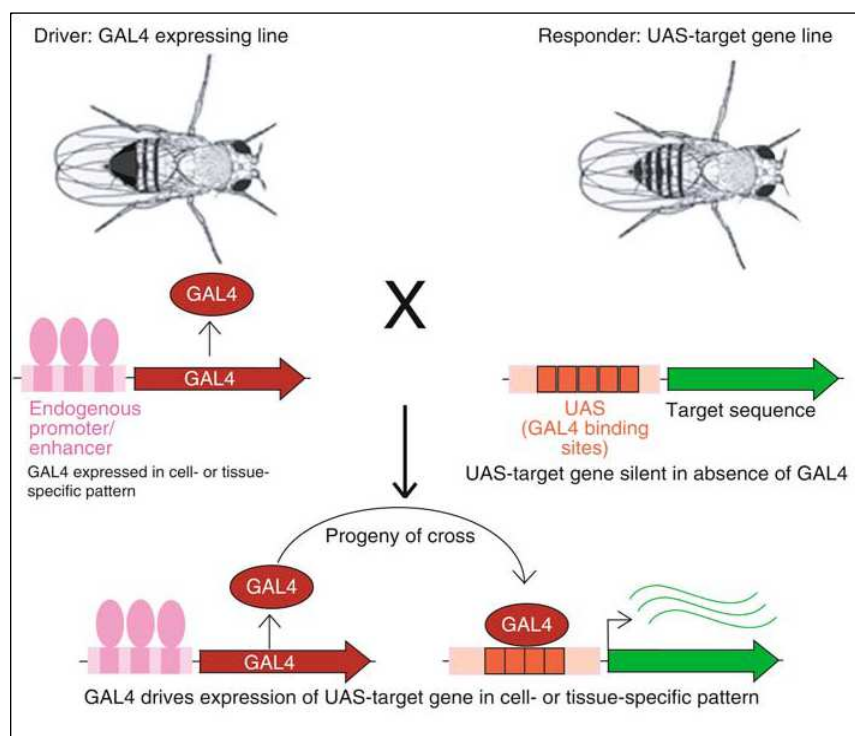


Fig. 2: Sistema UAS-GAL4. Sistema che permette l'espressione ectopica di un trasgene in modo cellulo-tessuto specifico. È basato sulla creazione di due linee transgeniche: nella prima, UAS-transgene, il gene d'interesse è posto a valle del dominio di attivazione UAS che corrisponde al sito di legame per Gal4; nella seconda GAL4, attivatore trascrizionale di lievito, è posto a valle di un promotore tessuto specifico. Solo quando le due linee vengono incrociate, nella progenie si avrà espressione tessuto specifica di Gal4 che andrà a legare la regione UAS con conseguente espressione del gene d'interesse (Phelps, 1998).

1.4. Il sistema nervoso in *Drosophila*: la giunzione neuromuscolare

Lo studio dei meccanismi attraverso i quali le sinapsi si assemblano e si modificano è un'area della neurobiologia dello sviluppo che negli ultimi anni è progredita molto rapidamente (Keshishian, 1996). Tutto questo è stato possibile grazie all'applicazione di numerosi strumenti di biologia molecolare accoppiati a raffinate tecniche di biologia cellulare che hanno permesso di determinare, in modo preciso, le perturbazioni dei componenti sinaptici i quali, insieme allo studio anatomico, hanno portato alla caratterizzazione degli elaborati meccanismi di sviluppo sinaptico. Sebbene la maggior parte del lavoro sia stato condotto su giunzioni neuromuscolari in vertebrati (Hall, 1993) un modello molto utilizzato per lo studio dello sviluppo e della plasticità delle sinapsi è *Drosophila*. Sia lo sviluppo a livello cellulare e molecolare delle giunzioni che

buona parte delle proteine coinvolte nella trasmissione sinaptica sono infatti conservate tra *Drosophila* e i vertebrati e presentano struttura o funzione simile (Keshishian, 1996). Il processo di neurogenesi in *Drosophila* ha inizio durante le fasi centrali dell'embriogenesi dove, a partire dai corpi cellulari dei neuroni che costituiscono il cervello, si sviluppano lunghi assoni che stabiliscono precise connessioni con i muscoli dando origine alle giunzioni neuromuscolari (NMs). Ciascuna giunzione è stata caratterizzata sia dal punto di vista morfologico che anatomico: sono stati determinati il numero di motoneuroni che innervano ogni singolo muscolo, il tipo di bottoni sinaptici che si sviluppano e è stata studiata la parete muscolare di larve al terzo stadio, che rimanere invariata anche nell'adulto (Hoang, 2001).

Il sistema neuromuscolare in *Drosophila* è composto da una serie di singole cellule muscolari polinucleate che si ripetono dando origine a sei segmenti orizzontali, ben evidenti in larve terzo stadio dissezionate, costituiti da circa 60 fibre muscolari ciascuno. Ogni fibra occupa, nella parete muscolare, una posizione caratteristica ed è innervata da motoneuroni definiti che si suddividono in 6 tipi principali e stabiliscono strutturalmente sinapsi diverse (Jia, 1993) (Fig. 3).

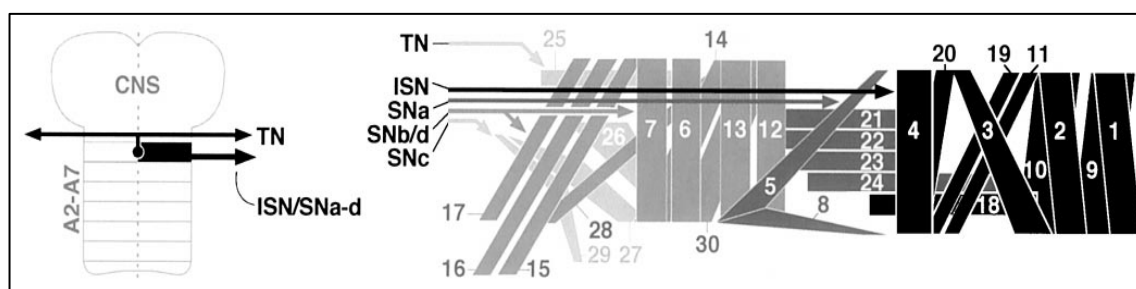


Fig. 3: Sistema neuromuscolare di Drosophila. Lo schema a destra rappresenta un emisegmento della parete muscolare in cui si mettono in evidenza le fibre muscolari e i motoneuroni. Tale struttura si genera a partire dalla fase centrale dell'embriogenesi per svilupparsi poi completamente, dando così origine ad un sistema neuromuscolare in cui ciascun motoneurone che parte dal ganglio centrale giunge al muscolo che andrà a controllare (Hoang, 2001).

Ciascuna terminazione nervosa presenta zone varicose, definite bottoni sinaptici, che sono connesse agli assoni e presentano un'ultrastruttura che varia a seconda del muscolo su cui poggiano (Jia, 1993; Hatwood, 1993) (Fig. 4).

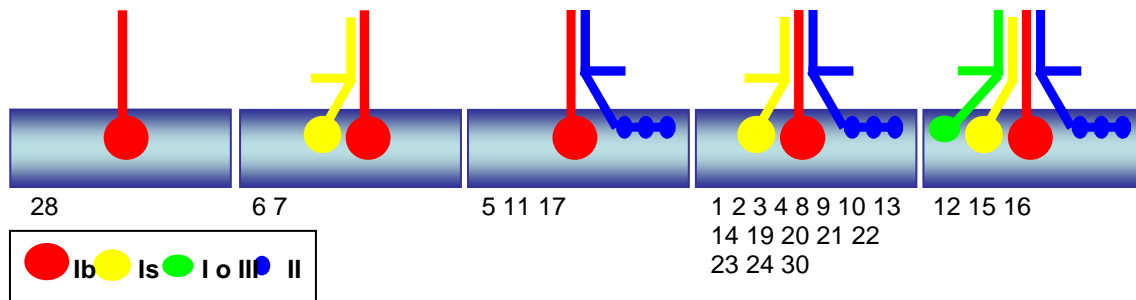


Fig. 4: Giunzioni neuromuscolari. Ad ogni fibra muscolare possono giungere da una a quattro terminazioni nervose (Ib, Is, I o III e II) che si distinguono per forma, dimensione e tipo di neurotrasmettitore che liberano; non giungono mai però terminazioni uguali tra loro (Hoang, 2001)..

2. I MITOCONDRI: ORGANELLI ESSENZIALI PER LA VITA DELLA CELLULA

Le cellule eucariotiche sono caratterizzate da un complesso sistema di membrane fosfolipidiche che, oltre a separare il citoplasma dall'ambiente extracellulare e dal nucleo, definisce specifiche compartimentazioni interne definite organelli, come il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi, e i mitocondri. Il citoplasma è costituito per la maggior parte di acqua, mentre i mitocondri, presenti in numero variabile a seconda del tipo e dello stato fisiologico cellulare, occupano circa il 25% del volume citoplasmatico totale.

I mitocondri sono organelli essenziali per l'omeostasi cellulare. La loro funzione primaria è di produrre energia: la respirazione mitocondriale fornisce la maggior parte di ATP necessaria per le reazioni endoergoniche. Inoltre, essi regolano i livelli e i transienti di calcio citosolico e hanno un ruolo cruciale nei processi di apoptosi, invecchiamento e stress ossidativo (Jouaville, 1995; Wang, 2001). Sono organelli altamente complessi e l'elaborata struttura è molto importante per la loro funzione.

Nei mitocondri è possibile distinguere quattro compartimenti fondamentali: la membrana mitocondriale esterna (OMM) ed interna (IMM), lo spazio intermembrana (IMS) e la matrice mitocondriale. Le due membrane mitocondriali hanno differenti proprietà, a causa della loro diversa composizione. La membrana esterna è composta per il 40-50% di lipidi e per la restante parte di proteine, tra cui alcuni enzimi che svolgono attività come l'ossidazione dell'adrenalina, l'allungamento degli acidi grassi e la degradazione del triptofano. Essa è permeabile alla maggior parte delle piccole molecole e degli ioni perché contiene molte copie di porina, una proteina di 30-35 kDa che forma canali transmembrana non selettivi, nota anche come VDAC (Canale

Anionico Voltaggio Dipendente). La IMM ha un rapporto proteine/lipidi di 3:1. L'assenza di porine e la presenza di molecole di cardiolipina (difosfatidil-glicerolo) determina la scarsa permeabilità ad anioni, cationi e protoni permettendo la formazione del gradiente transmembrana, utile per la funzionalità mitocondriale. Nella IMM sono compresi gli enzimi della catena di trasporto degli elettroni, l'ATP sintasi e alcune proteine di trasporto per le molecole metabolizzate nella matrice mitocondriale. Lo IMS è caratterizzato dalla presenza dell'enzima miochinasi, che catalizza la fosforilazione dell'adenosina 5'-monofosfato (AMP) ad adenosina 5'- difosfato (ADP). La matrice è una fase omogenea o finemente granulata, simile ad un gel a causa della concentrazione elevata di proteine idrosolubili (circa il 50%). Si ritiene che i granuli della matrice siano deputati al legame di cationi bivalenti come Mg^{2+} e Ca^{2+} : è noto infatti che i mitocondri rappresentano un importante deposito di calcio all'interno della cellula. La matrice inoltre contiene diversi enzimi, tra cui quelli del ciclo dell'acido citrico o degli acidi tricarbossilici, che fornisce gli equivalenti riducenti (sotto forma di NADH e FADH₂) che alimentano la catena respiratoria mitocondriale (Fig. 5).

Una caratteristica che contraddistingue i mitocondri dagli altri organelli è la presenza di un proprio DNA (mtDNA), che viene trascritto e tradotto in modo indipendente dal DNA genomico della cellula, racchiuso invece nel nucleo. L'ipotesi più accreditata per spiegare questa peculiare caratteristica e la complessa struttura di questi organelli è quella dell'origine endosimbiontica; secondo questa teoria, i mitocondri avrebbero deriverebbero da un batterio aerobio che si è adattato a vivere all'interno di una cellula eucariotica ancestrale anaerobia.

Un'altra peculiarità di questi organelli è il loro comportamento dinamico: la morfologia mitocondriale infatti è eterogenea e regolata da processi di fusione e fissione che portano rispettivamente alla fusione di mitocondri vicini tra loro e alla formazione di più unità mitocondriali a partire da un unico organello (Chen, 2003).

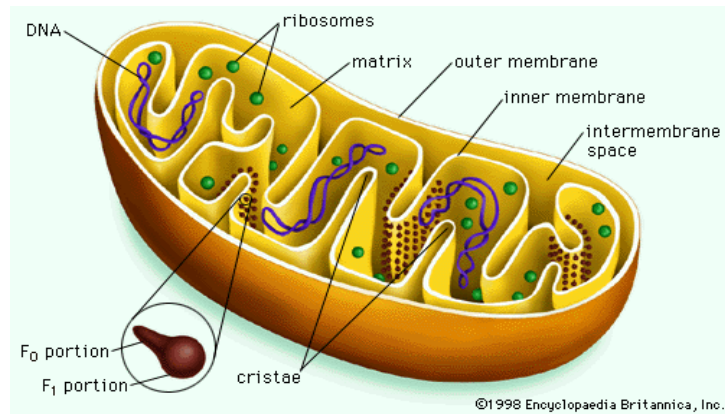


Fig. 5: Rappresentazione schematica di un mitocondrio. Sono messe in evidenza le varie componenti: la membrana esterna, quella interna ripiegata in creste, la matrice mitocondriale, il materiale genetico e i ribosomi [b].

2.1. Funzione dei mitocondri

I mitocondri sono considerati il centro energetico della cellula perché attraverso la fosforilazione ossidativa producono la maggior parte dell'ATP cellulare. Il ciclo degli acidi tricarbossilici (Ciclo di Krebs), il complesso piruvato deidrogenasi, la β -ossidazione degli acidi grassi e parte del ciclo dell'urea sono localizzati nella matrice; la catena respiratoria, il processo di sintesi dell'ATP e gli enzimi coinvolti nella biosintesi dell'eme sono associati alla IMM. Quest'ultima svolge un ruolo centrale nella fosforilazione ossidativa grazie alla sua impermeabilità ai protoni: in seguito al pompaggio di protoni dalla matrice allo IMS da parte della catena respiratoria si genera un gradiente protonico che viene quindi utilizzato dall'ATP sintasi per produrre ATP, a partire da ADP e fosfato inorganico (Pi).

La concentrazione di calcio libero nelle cellule può regolare varie reazioni ed è importante per la trasduzione del segnale. I mitocondri possono funzionare come depositi temporanei di calcio contribuendo all'omeostasi generale di questo ione, grazie alla loro capacità di immagazzinarlo rapidamente. Il calcio viene importato nella matrice attraverso un uniporto guidato dal potenziale di membrana sulla IMM e rilasciato attraverso proteine di scambio $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ o mediante una via di rilascio attivata dal calcio stesso. I mitocondri funzionano quindi come riserva intracellulare di calcio insieme al reticolo endoplasmatico (ER), con il quale c'è stretta comunicazione. Per la funzione energetica che svolgono e per le molteplici vie metaboliche da essi controllate, i mitocondri sono fondamentali nella regolazione del metabolismo cellulare. Tra le molte funzioni che ricoprono non ultime sono la regolazione della

proliferazione cellulare e la partecipazione al processo di morte cellulare programmata (apoptosi).

2.2. La fosforilazione ossidativa

La fosforilazione ossidativa è il processo attraverso il quale si produce ATP in seguito al trasferimento di elettroni dal NADH o dal FADH₂ all'ossigeno molecolare (O₂), mediante una serie di complessi proteici localizzati nella IMM che costituiscono la catena respiratoria per il trasporto degli elettroni (ETC). Questo processo è la principale fonte di ATP degli organismi aerobi.

Durante la fosforilazione ossidativa il NADH o il FADH₂ generati dall'ossidazione degli acidi grassi e dal ciclo di Krebs, vengono utilizzati come donatori di elettroni e l'ossigeno molecolare come accettore finale. Il NADH è un forte agente riducente, mentre l'ossigeno è un forte ossidante in grado di accettare elettroni.

Il flusso di elettroni dal NADH o dal FADH₂ attraverso i complessi enzimatici è quindi un processo esoergonico la cui variazione di energia libera è sfruttata per il pompaggio di protoni dalla matrice allo IMS. La concentrazione di H⁺ più bassa nella matrice genera un gradiente di pH (ΔpH) e un gradiente di potenziale elettrico transmembrana ($\Delta\psi$) che in condizioni fisiologiche assume valori tra -150 mV e -200 mV. Il gradiente di pH e il potenziale elettrico sono gli elementi che compongono la forza motrice protonica ($\Delta\mu\text{H}$).

Secondo l'ipotesi chemiosmotica di Mitchell, questa forza motrice protonica è utilizzata dall'ATP sintasi, che catalizza la produzione di ATP a partire da ADP e Pi. Gli equivalenti riducenti come il NADH o il FADH₂ entrano nella catena respiratoria a livello del Complesso I (CI) e del Complesso II (CII). Gli elettroni poi vengono trasferiti attraverso i vari complessi transmembrana della catena, seguendo i potenziali di ossidoriduzione di ciascuna specie redox (Lehninger, 2000). Due elettroni per ogni NADH ossidato dal CI sono trasferiti al trasportatore mobile di elettroni ubiquinone, o Coenzima Q (CoQ), che viene ridotto a chinolo. Analogamente al CI anche il CII, catalizzando l'ossidazione del succinato a fumarato è in grado di ridurre l'ubichinone a ubiquinololo. Il Complesso III catalizza l'ossidazione del chinolo a chinone, trasferendo gli elettroni al citocromo C (CytC), il secondo trasportatore mobile di elettroni dell'ETC. Il CytC ridotto viene ossidato a livello del Complesso IV (CIV), che trasferisce gli elettroni all'ossigeno molecolare riducendolo ad acqua.

L'energia libera resa disponibile dal flusso di elettroni all'interno dei complessi enzimatici dell'ETC è accoppiata al trasporto endoergonico di protoni nello IMS da parte dei Complessi I, III e IV, attraverso la IMM. Tale trasporto genera la forza elettromotrice protonica che spinge i protoni dallo spazio intermembrana verso la matrice. Poichè la IMM è impermeabile ai protoni, questi per rientrare devono attraversare il canale transmembrana specifico del settore FO dell'ATP sintasi che costituisce il Complesso V (CV). La forza motrice che spinge i protoni verso la matrice fornisce l'energia necessaria alla sintesi di ATP, catalizzata dal settore F1 dell'ATP sintasi. Parte dell'ATP generata attraverso la fosforilazione ossidativa è utilizzata dal mitocondrio mentre la maggior parte è trasportata fuori dall'organello mediante il traslocatore adenin-nucleotidico (ANT) e utilizzata per le diverse funzioni cellulari (Fig. 6).

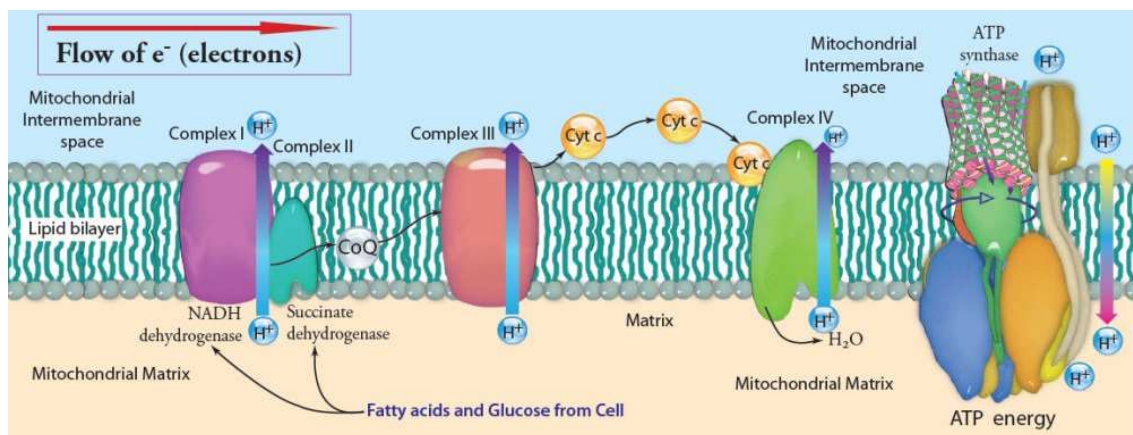


Fig. 6: Modello dinamico del trasferimento elettronico. I quattro complessi della catena di trasferimento degli elettroni funzionano in modo del tutto indipendente l'un dall'altro e sono presenti nella IMM. Il complesso I accetta elettroni dal NADH, collegando ETC con la glicolisi, il ciclo degli acidi tricarbossilici e l'ossidazione degli acidi grassi. I complessi I e II formano un prodotto comune, il CoQ ridotto che a sua volta è substrato del Complesso III, il quale lo ossida con conseguente riduzione del CytC che diventa substrato per complesso IV. Infine quest'ultimo catalizza la riduzione dell'ossigeno molecolare. Si genera così un gradiente protonico necessario alla sintesi di ATP mediata dall'ATP sintasi [c].

Nonostante esistano molte informazioni sulla struttura dei singoli complessi proteici transmembrana che fanno parte della ETC, ci sono ancora poche conoscenze sull'organizzazione sopramolecolare di questi complessi. A tal proposito sono stati

proposti alcuni modelli per spiegare la struttura generale dell'ETC. L'iniziale modello "Solid-state" in cui il trasferimento degli elettroni avveniva attraverso una serie di complessi ordinati all'interno dell'ETC, venne sostituito gradualmente, in seguito ad osservazioni che dimostrano che i singoli complessi sono in grado di funzionare anche individualmente (Chance 1955). Il modello "Solid-state" venne quindi sostituito con il "Random collision model", secondo il quale i complessi che fanno parte dell'ETC sono localizzati in modo casuale nel doppio strato lipidico della IMM e il trasferimento elettronico avviene attraverso casuali collisioni tra le piccole molecole diffusibili, come il CoQ e il CytC (Hackenbrock, 1986).

Nonostante quest'ultimo modello si sia diffuso notevolmente, il concetto dell'organizzazione secondo il modello "Solid state" non è stato abbandonato. Sono state osservate infatti associazioni preferenziali tra specifici complessi e sono stati isolati supercomplessi stabili costituiti da CI e CIII. In base a queste ultime osservazioni è stato elaborato il modello del "Respirosoma": i complessi non sono totalmente indipendenti l'uno dall'altro, ma formano supercomplessi, cioè aggregati stabili che comprendono i Complessi I, III e IV in diversi rapporti stechiometrici (Schägger, 2000; Bianchi, 2004).

3. MORFOLOGIA E DINAMICITÀ MITOCONDRIALE

I mitocondri sono stati descritti per la prima volta nel 1857 da Rudolf Albrecht von Koelliker e successivamente, nel 1950, Sjostrand e Palade hanno condotto lavori pionieristici di microscopia elettronica applicata allo studio dei mitocondri. Entrambi osservarono che questi organelli intracellulari presentano due membrane a doppio strato fosfolipidico: una esterna (OMM), che li separa dal resto del citoplasma, e una interna (IMM). Queste due membrane dividono l'organello in due distinti compartimenti solubili: lo spazio intramembrana (IMS) tra la OMM e la IMM e la matrice mitocondriale, racchiusa dalla IMM. La loro interpretazione delle immagini ottenute in microscopia aveva però portato alla formulazione di due modelli diversi: il modello di Sjostrand spiegava la compartimentazione osservata all'interno del mitocondrio con la presenza di setti connessi alla IMM, che delimitavano degli spazi (Sjostrand, 1956) mentre il modello di Palade, chiamato "Baffle Model" (Fig 7A), in cui la compartimentazione originava da invaginazioni della IMM proiettate verso la matrice, dette creste mitocondriali (Palade, 1952). Secondo questo modello, la IMM è una superficie continua con una complessa morfologia e le creste che si formano sono aperte allo IMS da un lato e protrudono verso la matrice nel lato opposto (Fig. 7B).

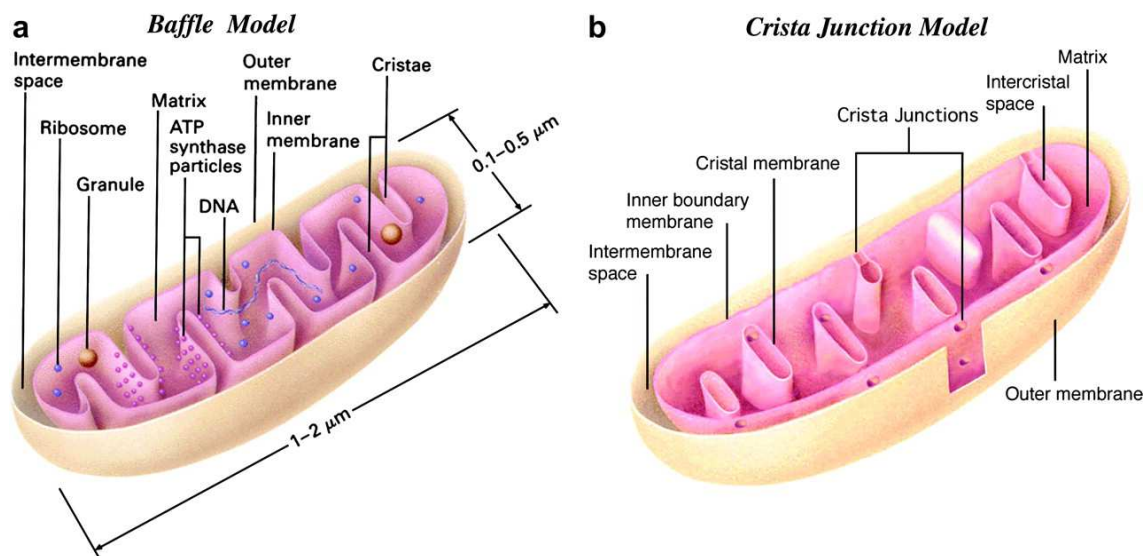


Fig. 7: Modelli di struttura della membrana mitocondriale. A) Il modello "Baffle" è nato con Palade nel 1950. Secondo questo modello i mitocondri presentano un'unica IMM che da origine a ripiegamenti detti creste che protrudono nella matrice mitocondriale. B) Il modello "crista junction" è un modello più complesso ottenuto da studi di tomografia elettronica su mitocondri in situ. Tali studi hanno permesso di identificare la presenza di giunzioni che collegano le creste mitocondriali alla IMM. La maggior parte delle creste presenta più giunzioni che possono essere disposte nello stesso lato se la cresta protrude nella matrice o in entrambi i lati se la cresta attraversa completamente la matrice [d]

Studi condotti da Hackenbrock dimostrarono in seguito che i mitocondri isolati sono soggetti a cambiamenti conformazionali in funzione dello stato metabolico e della condizione osmotica a cui sono sottoposti. La matrice si contrae producendo una conformazione "condensata" in cui la IMM si allontana dalla OMM eccetto in alcuni punti chiamati "punti di contatto". Inoltre sono state osservate più connessioni tra le creste e tra quest'ultime e la IMM (Hackenbrock, 1966). Al contrario, i mitocondri osservati in situ si trovano per lo più nella conformazione classica, caratterizzata da un ampio volume della matrice, la IMM è molto vicina alla OMM e si osservano poche connessioni tra le creste mitocondriali. La frequenza con cui le creste sono connesse alla IMM può quindi variare in funzione dello stato del mitocondrio, a differenza di quanto proposto nel modello di Palade. Attraverso lo studio dei mitocondri tramite sottili

sezioni in serie, Daeme e Wisse osservarono che le creste erano connesse alla IMM attraverso strutture tubulari del diametro di circa 30 nm dette “pediculi cristae” . La tomografia elettronica (TEM) e la microscopia elettronica a trasmissione ad elevata risoluzione (HRSEM) hanno confermato questi ultimi risultati ed hanno fornito nuove evidenze sulla compartimentazione mitocondriale. A differenza delle tecniche che usano sottili sezioni di tessuto in serie (50- 80 nm), la tomografia utilizza sezioni abbastanza spesse (0,25- 1,0 μm) in modo da contenere una porzione rappresentativa del volume mitocondriale. Le nuove immagini mostravano chiaramente la struttura tubulare delle creste indipendente strutturalmente dalla IMM e tubuli sottili (30- 40 nm di diametro) e lunghi qualche centinaio di nanometri. Le creste mitocondriali sono connesse tra loro e allo IMS mediante strette giunzioni tubulari (crista junctions) di circa 28 nm di diametro (Perkins, 1997) (Fig. 8).

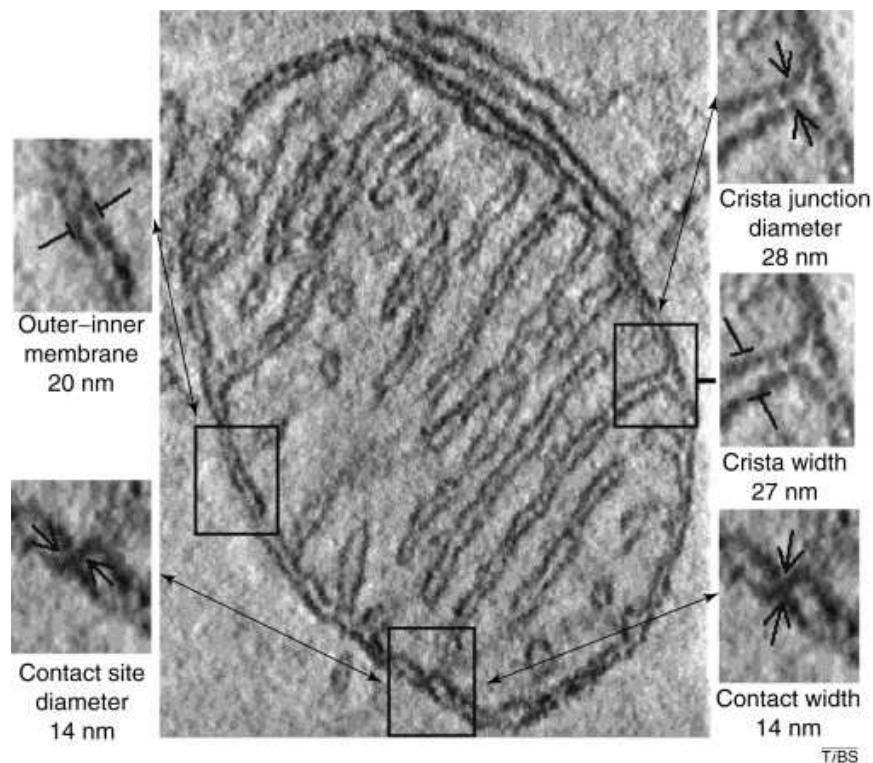


Fig. 8: Tomografia elettronica di un mitocondrio. Dall'immagine sono ben visibili le membrane, esterna ed interna, lo spazio intermembrana, le creste mitocondriali e le giunzioni che connettono le creste alla membrana interna (Frey, 2000).

3.1. Meccanismo di fusione e fissione

Nelle cellule, i mitocondri presentano forma eterogenea, che varia da piccole sfere a lunghi tubuli interconnessi, come è stato spesso notato dai citologi durante l'osservazione delle cellule al microscopio (Bereiter-Hahn, 1994). La plasticità mitocondriale è il risultato dell'abilità di questi organelli di subire processi di fusione e fissione, meccanismi complessi che hanno inizio con l'interazione tra proteine localizzate sulle membrane mitocondriali e portano rispettivamente all'aggregazione e alla frammentazione dei mitocondri. Fusione e fissione non sono responsabili solo del rimodellamento di questi organelli, ma sono coinvolte nella regolazione di altri processi mitocondriali e cellulari. In primo luogo, fusione e fissione controllano la forma, la lunghezza e il numero di mitocondri: un perfetto equilibrio tra i due meccanismi infatti è fondamentale per la morfologia mitocondriale. In secondo luogo, i due processi consentono lo scambio, tra due mitocondri, di lipidi di membrana e del contenuto intramitocondriale, scambio che probabilmente è essenziale per il mantenimento dell'integrità degli organelli e per il loro turnover. Infine, fusione e fissione sono responsabili della regolazione dei segnali elettrici e biochimici mitocondriali, come omeostasi del calcio, segregazione e protezione del DNA mitocondriale (Chen, 2007) e dell'abilità della cellula di distribuire i mitocondri in compartimenti subcellulari specifici (Mattson, 2008). Questa caratteristica è fondamentale per le cellule polarizzate come i neuroni e variazioni nella fusione e nella fissione alterano la distribuzione mitocondriale assonale. Ad esempio, nei neuroni dell'ippocampo, i mitocondri si accumulano nei dendriti spinali in seguito a stimoli neuronali. L'inibizione della fissione causa una modifica della morfologia mitocondriale: i mitocondri appaiono allungati e si riduce il numero di quelli che raggiungono i dendriti. Al contrario, un aumento della fissione porta alla mobilitazione di un maggior numero di mitocondri ai dendriti (Li, 2004).

I meccanismi di fissione e fusione coinvolgono numerose proteine, tra cui alcune necessarie per il mantenimento della corretta morfologia mitocondriale. Più di 20 geni che le codificano sono stati identificati in *Saccharomyces cerevisiae*, altri in *Drosophila* ed infine alcuni ortologhi in mammifero. Le più importanti coinvolte nel processo di fusione sono Mitofusina 1 e Mitofusina 2 (Mfn1 e Mfn2), proteine integrali di membrana localizzate nella OMM, e Optic atrophy 1 (Opa1), membro della famiglia delle dinamine, localizzata nella IMM e coinvolta in patologie come l'atrofia ottica autosomica dominante (ADOA). La principale proteina responsabile del processo di fissione è dynamin-related protein 1 (Drp1), GTPasi citosolica che, se reclutata sulla OMM porta alla formazione di una costrizione che ha come risultato la divisione del

mitocondrio in due organelli separati (Fig. 9). Drp1 interagisce con 4 proteine di membrana che fungono da recettore per la proteina stessa: Fission 1 (Fis 1) mitochondrial fission factor (Mff), mitochondrial dynamics proteins di 49 e 51 kDa (MiD49 and MiD51, rispettivamente) (Westermann, 2010; Gandre-Babbe, 2008; Otera, 2010; Palmer, 2011; Losón, 2013). Sembra essere inoltre coinvolta la proteina ganglioside induced differentiation associated protein 1 (Gdap1), che favorisce il legame tra Drp1 e Mff (Niemann, 2005; Niemann 2009).

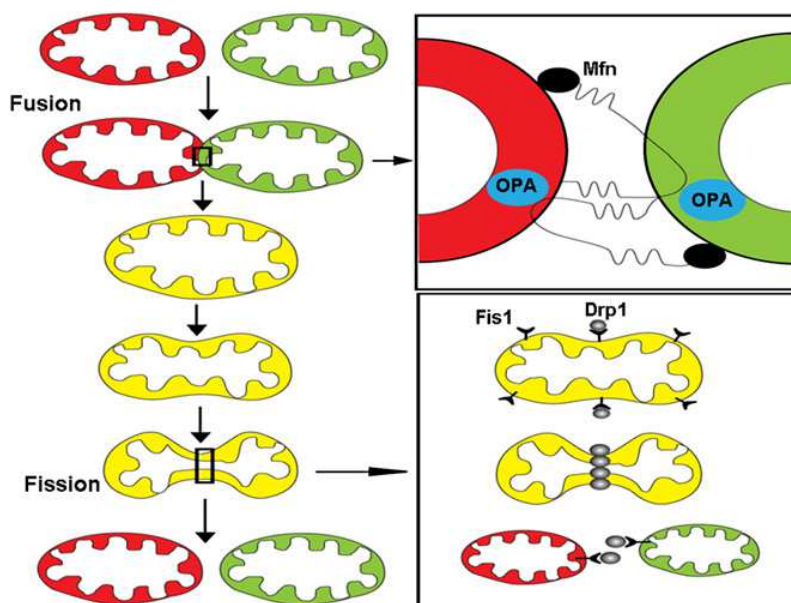


Fig. 9: Meccanismo di fusione e fissione mitocondriale. I mitocondri possono fondere tra loro e scambiarsi parti di membrana e componenti della matrice (in alto a sinistra) . La fusione della membrana mitocondriale esterna è mediata da interazioni dei domini citosolici di Mfn1 e Mfn2, proteine localizzate nella membrana esterna. Opa1, proteina che si trova nello spazio intramembrana è invece coinvolta nella fusione delle membrane interne(in alto a destra). La fissione mitocondriale (in basso a destra) coinvolge il reclutamento di Dpr1, dynamin-related protein 1, da parte di Fis1, sulla proteina della membrana esterna (Mattson, 2008).

3.2. Proteine coinvolte nel processo di fusione

3.2.1. Fzo1/Marf/Mfn1 e Mfn2

La prima proteina coinvolta nei processi di fusione mitocondriale è stata identificata in *Drosophila*: Fuzzy onion protein 1 (Fzo1). Fzo1 è una GTPasi di membrana localizzata nella OMM e altamente conservata dal punto di vista evolutivo. In *Drosophila* il gene FZO viene attivato durante la spermatogenesi e mutazioni nella sequenza genica

causano sterilità nei maschi (Hales, 1997). Fzo1 infatti media la formazione di mitocondri giganti avvolti l'uno sull'altro necessari alla produzione di energia per il movimento del flagello degli spermatici. Nei mutanti FZO1 viene meno il processo di fusione e i mitocondri risultano frammentati. *Drosophila* possiede anche il gene mitochondrial assembly regulatory factor (MARF), espresso in modo ubiquitario tra maschi e femmine ed omologo al gene MFN umano responsabile della fusione mitocondriale in mammifero (Santel, 2001). Nel tessuto muscolare la riduzione di espressione di Marf induce frammentazione e alterazione della morfologia del mitocondrio (Deng, 2008). Inoltre, mutanti MARF mostrano una severa deplezione dei mitocondri nelle giunzioni neuromuscolari (NMJs) ed un'alterazione della morfologia della giunzione caratterizzata dall'aumento del numero e da una riduzione della dimensione dei bottoni sinaptici (Sandoval, 2014). In *Saccharomyces cerevisiae*, invece, Fzo1 media eventi di fusione mitocondriale durante la mitosi ed è necessario per il mantenimento a lungo termine del mtDNA (Hermann, 1998; Rapaport, 1998).

Nei mammiferi sono presenti due geni, Mitofusina 1 (MFN1) e Mitofusina 2 (MFN2), coinvolti entrambi nel controllo della fusione mitocondriale (Santel, 2001). Entrambi sono espressi ubiquitariamente ma i livelli di mRNA e proteina nei diversi tessuti varia in modo significativo (Kawalec, 2014). Tra loro presentano un'elevata omologia di sequenza genica (81%) e codificano proteine che si inseriscono integralmente nella OMM (Rojo, 2002; Santel, 2003), con entrambi i domini N- e C-terminali citosolici. La regione N-terminale contiene un dominio GTPasico e una porzione idrofobica di 8 amminoacidi ripetuti (HR1) mentre la regione C-terminale presenta la porzione HR2 che può facilitare il legame con altre regioni HR2 e la fusione delle membrane di mitocondri che interagiscono tra loro (Fig. 11).

Studi di fusione in cellule knockout (KO) per MFN1 e/o MFN2 dimostrano che: 1) la mancanza di Mfn1 o Mfn2 riduce notevolmente i processi di fusione mitocondriale; 2) la mancanza di entrambe le mitofusine abolisce la fusione mitocondriale; 3) Mfn1 e Mfn2 devono essere presenti in entrambe i mitocondri che vanno incontro al processo di fusione; 4) è necessario che il dominio GTPasico sia funzionale perché si inneschi il meccanismo. (Chen, 2003; Koshiba, 2004). Nonostante elevata omologia di sequenza e struttura, studi *ex vivo* e *in vivo* mostrano importanti differenze funzionali di Mfn1 e Mfn2. Sebbene l'affinità di legame con il GTP sia più bassa, Mfn1 ha attività GTPasica maggiore rispetto Mfn2 e dunque anche una più alta capacità di indurre fusione (Ishihara, 2004). Ciò è stato dimostrato in quanto, misurando la velocità di fusione mitocondriale in cellule KO per MFN-1 o MFN-2 si è visto che tale capacità viene

mantenuta principalmente in cellule che esprimono Mfn1. Inoltre, topi KO per MFN1 o MFN2 non presentano lo stesso fenotipo: nel primo caso i topi muoiono nella fase centrale della gestazione mentre nel secondo caso gli embrioni mostrano un errato sviluppo della placenta, non associato a topi KO per MFN1 (Chen, 2003).

3.2.1.1. Mitofusina: sequenza, struttura e funzione

L'allineamento tra le sequenze proteiche di Mfn2 umana e Marf permette di evidenziare tre regioni altamente conservate: la regione GTPasica, i domini HR1 e HR2

D-Mfn	69	DKSPLQIFVRAKKKINDIYGEIEEYVHETTFINALHAEAEI--VDKAEREL-FESYVYK	125
		+ SPL+ FV AKKKIN I+ ++ Y+ E+ TF+ + AE+ V E+ L + Y+ K	
H-Mfn2	25	NASPLKHFVTAKKKINGIFEQLGAYIQESATFLEDTYRNAELDPVTTEEQVLDVKGYLK	84
D-Mfn	126	VAAIREVLQRDHMKVAFFGRTSNGKSSVINAMLRKILPSGIGHTTNCFCQVEGSNGGEA	185
		V I EVL R HMKVAFFGRTSNGKS+VINAML +K+LPSGIGHTTNCF +VEG++G EA	
H-Mfn2	85	VRGISEVLARRHMKVAFFGRTSNGKSTVINAMLWDKVLPSGIGHTTNCFLRVEGTDGHEA	144
D-Mfn	186	YLMTEGSEEEKLNVVNIKQLANALCQEK-LCESSLVIRIFWPRERCSSLRDDVVVFDSPGVD	244
		+L+TEGSEEK + + QLA+AL Q+K L SLV + WP +C LL+DD+V +DSPG+D	
H-Mfn2	145	FLLTEGSEEKRSKATVNQLAHLAQDKQLHAGSLVSMWPNKCPLLKDDLVLMDSPGID	204
D-Mfn	245	VSANLDDWIDNHCLNADVFVLVLAESTMTRAEKQFFHTVSQKLSKPNIFILNRRWDASA	304
		V+ LD WID CL+ADVFLV N+EST+ + EK FFH VS++LS+PNIFILNRRWDASA	
H-Mfn2	205	VTTELDSWIDKFCLDADVFVLVANSESTLMOTEKHFHFKVSRERLSRPNIFILNRRWDASA	264
D-Mfn	305	NEPECQESVKSQHTERCIDFLTKEKLVKSNEKEAAERVFVSARETLQARIEEAKGNPPHM	364
		+EPE E V+ QH ERC FL EL V + +A +R+FFVSA+E L ARI++A+G P	
H-Mfn2	265	SEPEYMEEVRRQHMERCTSPFLVDELGVVDRSQAGDRIFVSAKEVLNARIQKAQGMPEGG	324
D-Mfn	365	GAIAEGFQIRYFEFQDFERKFEECISQSAVTKTFQOHSSRGRKSVSGDMKSMLDNIYERIT	424
		GA+AEGFQ+R FEFQ+FER+FEECISQSAVTKTF+QH+ R K ++ ++ ++D+++	
H-Mfn2	325	GALAEGFQVRMFEFQNFERRFEECISQSAVTKTFEQHTVRAKQIAEAVRLIMDSLHMAAR	384
D-Mfn	425	IFRNKQDQKNLLTERIQGTETQMVTREMKMKIHNMVVEEVEEKVSKALNEEIIWRLGVL	484
		+ ++ + +R+++ + Q+ + ++ K++I + EEVE +VS A+ EEI RL VL	
H-Mfn2	385	EQQVYCEEMREERQDRLKFDKQLLELLAQDYKLRKQITEEVERQVSTAMAEIIRRLSVL	444
D-Mfn	485	IDFNMPFHPERLVLNIIYKKELNHAVESGLGSNLRARLSMALAMNVESAQTEMTDRMHAL	544
		+D++ M FHP +VL +YK EL+ H+E GLG N+ R S A+ +++++ Q +M D + L	
H-Mfn2	445	VDDYQMDFFHSPFVVLKVYKNEHRHIEEGLGRNMSDRCTAITNSLQTMQQDMIDGLKPL	504
D-Mfn	545	VPNEQLLATSTKMVVRTQPFEMLYSLNQCNLCAQFQEDLEFKFSWGIAAMIQRFTGKVRE	604
		+P + + M+V Q F + Y LNC LCADFQED+EF FS G ++ RF G	
H-Mfn2	505	LPVS--VRSQIDMLVPRQCFSLNYDLNCDKLCADFQEDIEFHFSLGMTLVNRFGLGPKNS	562
D-Mfn	605	RSKKGQPALVNRQSSIGVSFYSIVLHLLHYISAIESRSQHSVSTPTTTPVEATPVCLLP	664
		R R+ + P+ TP	
H-Mfn2	563	R-----R-ALMGYNDQVQRPIPLTPANPSM	586
D-Mfn	665	APVVAG-ITPEQLSLISRFAVSSIGSQGTVGGVLVAGVMLKTIGWRV/VLGVGALYGCITYL	723
		P+ G +T E+ + ++S+ S+ ++G LVV GV+ K +GWR++ LYG +Y+	
H-Mfn2	587	PPLPQGSALTQEEFMVSMVTGLASITSRSTSMGILVVGGVWVAVGWRVLIALSFLYGLLYLV	646
D-Mfn	724	YERLSWTNSAKERTFKSQYVRHATKCLKMIVDLTANCSHQVQQLSSTFARLCRTVDTA	783
		YERL+WT AKER FK Q+V HA++KL++++ T +NCSHQVQQLS TFA LC+ VD	
H-Mfn2	647	YERLTWTTKAKERAPKRFQVEHASEKLQLVISYTGSNCSHQVQQLSGTF AHLCCQQVDVT	706
D-Mfn	784	TTDMNDELKTLDSQLNILEANQKQLKLLRNKANYIQNELDIFEHNYISF	832
		++ E+ ++ ++ +L++ Q + KLLRNKA ++ +EL++F H Y+ P	
H-Mfn2	707	RENLEQEIAAMNKKIEVLDLSLQSKAKLLRNKAGWLDSELNMFTHQYLOP	755

e la porzione transmembrana (TM) (Fig. 10, Fig. 11).

Fig. 10: Allineamento di sequenza tra Mfn2 e Marf. Le due proteine presentano, seppur derivando da due specie lontane dal punto di vista evolutivo, elevato grado di omologia, che è mantenuta nel dominio GTPasico (in rosso), nei domini HR1 e HR2 (in verde) e nei segmenti transmembrana (in blu).

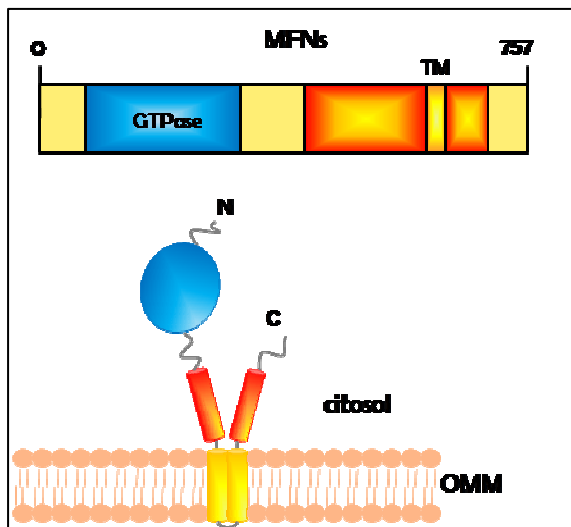


Fig. 11: Struttura di Mitofusina. In alto, la rappresentazione schematica del gene MFN, che mette in evidenza i principali domini conservati. In basso, la struttura proteica di Mfn. Mfn è una proteina localizzata a livello della OMM. Presenta quattro domini principali: nella porzione citosolica si trova il dominio GTPasico N-terminale (in azzurro) seguito da una regione di 8 amminoacidi ripetuti (HR1) e una seconda regione HR2 al C-terminale (in rosso). La proteina è ancorata alla membrana grazie a due segmenti transmembrana (in giallo). Questi domini presentano un'elevata omologia con Mitofusina di Drosophila (Marf) (Knott,2008).

Oltre ad essere coinvolta nel meccanismo di fusione mitocondriale, mitofusina, nei mammiferi, svolge anche un ruolo fondamentale nello sviluppo, nella regolazione di funzioni cellulari quali metabolismo ossidativo, ciclo cellulare e tethering mitocondri-reticolo endoplasmatico.

Mfn2 sembra avere un ruolo anche nell'apoptosi, processo di morte cellulare programmata che coinvolge numerosi fattori pro- e antiapoptotici. Essa infatti è presente nel sito fissione mitocondriale durante l'apoptosi insieme a Drp1 e al fattore pro-apoptotico Bax (Kerbowski, 2006) e, nel caso della mutazione $MNF2^{RasG12V}$, che rende Mfn2 costitutivamente attiva, essa inibisce l'attivazione Bax, il rilascio di CytC e la progressione nel processo di morte cellulare (Neuspiel, 2005).

A differenza di Mfn1, Mfn2 è collegata a parecchie vie metaboliche. Studi hanno evidenziato che una modifica dell'espressione di Mfn2 *in vivo* e *in vitro* altera i processi di ossidazione del glucosio e, in particolare, mutazioni loss of function (LOF) di Mfn2 portano alla riduzione del consumo di ossigeno, dell'ossidazione del glucosio, del piruvato e degli acidi grassi (Bach, 2005). Infatti, Mfn2 è direttamente coinvolta nell'omeostasi di metaboliti e co-fattori come il glucosio e il CoQ, contribuendo quindi al pathway dell'insulina (Mourier, 2015).

Inoltre, Mfn2 ha un ruolo nella regolazione del processo di proliferazione cellulare: in cellule muscolari lisce che costituiscono la parete dei vasi sanguigni (VSMC), MFN2 è nominata gene soppressore dell'iperplasia (HSG) (Chen, 2004). In queste cellule, dove

normalmente è poco espressa, una sua sovraespressione causa il blocco del ciclo cellulare in fase G0/G1 con conseguente alterazione della proliferazione cellulare e sviluppo di patologie cardiovascolari proliferative.

Studi hanno messo in evidenza che la mancanza di Mfn2 è associata all'alterazione della morfologia del reticolo endoplasmatico (ER). Questo fa supporre che Mfn2 sia presente sia sulla OMM sia sulla membrana del ER e possa quindi mediare il legame tra i due organelli (De Brito, 2008). Tuttavia, recenti studi mostrano controversie sul tethering mitocondri-ER (Filadi, 2015).

Infine, studi su neuroni in coltura e studi *in vivo* in Zebrafish hanno messo in evidenza il ruolo di Mfn2 sul movimento mitocondriale. Mfn2 sembra interagire con Miro, proteina coinvolta nel traffico mitocondriale anterogrado: mutazioni in Mfn2 inibiscono il legame con Miro causando l'alterazione del trasporto mitocondriale assonale. (Chapman, 2013; Misko, 2012).

3.2.2 Mgm1p/Msp1p/Optic atrophy 1

Un'altra proteina importante nel meccanismo di fusione è Optic atrophy 1 (Opa1), membro della famiglia delle dinamine, localizzata nello IMS e associata alla IMM. MGM1p, omologo di OPA1, è stato identificato durante lo screening dei geni nucleari in *S. cerevisiae* (Jones, 1992), successivamente isolato da *S pombe* (MSP1p) (Pelloquin, 1999) e solo nel 2000 identificato nell'uomo (Alexander, 2000, Delettre, 2000). Sebbene MGM1 e OPA1 presentino solo un 20% di identità nella sequenza genica, mantengono la medesima struttura secondaria proteica. Tale struttura prevede la presenza di un dominio N-terminale in cui è presente una sequenza di localizzazione mitocondriale (MTS) costituita da amminoacidi carichi positivamente come lisina e arginina, un segmento consecutivo idrofobico, un dominio GTPasico e un dominio C-terminale coiled-coil GTPase effector domain (GED) (Satoh, 2003) (Fig. 12). L'elevato grado di omologia della struttura secondaria suggerisce che la funzione di Opa1 è conservata nei mammiferi. Nonostante questo, non è chiaro il ruolo di Opa1 nella fusione e nella fissione mitocondriale, infatti elevati livelli di Opa1 causano frammentazione del network mitocondriale.

Il processo di biogenesi di OPA1 è molto complesso e prevede sia modifiche trascrizionali sia post-trascrizionali (Müller-Rischart, 2013). Durante il processo di traduzione OPA1, nei mammiferi, può subire splicing alternativo del pre-mRNA nell'esone 4, 4b e 5b ottenendo così 8 isoforme, espresse in modo tessuto specifico (Delettre, 2001). Queste isoforme possono modulare la funzione di Opa1 in base alle varianti della proteina

dopo lo splicing (Olichon, 2007). Inoltre, negli esoni 5 e 5b sono presenti due siti di taglio proteolitico, S1 e S2, che portano alla formazione di un'isoforma corta, priva del dominio transmembrana (S-Opa1). Le isoforme che non vengono sottoposte a taglio proteolitico costituiscono il pool nella forma lunga (L-Opa1) (Fig. 13). È stato ipotizzato che nei processi di fusione mitocondriale entrino in gioco entrambe le isoforme che, assemblandosi in complessi oligomerici, mantengono la struttura delle creste mitocondriali (Song, 2007). In condizioni di stress tali complessi disassemblano favorendo così la conversione di L-Opa1 in S-Opa1 con conseguente inibizione del processo di fusione (Ishihara, 2006). S-Opa1 costituisce la forma solubile di Opa1 che svolge un ruolo importante nel processo di apoptosi (Frezza, 2006). In recenti studi sono state individuate altre due proteine coinvolte nel processo di proteolisi di Opa1, la peptidasi Oma1 e la i-AAA proteasi Yme1, che processano Opa1 rispettivamente in S1 e S2 (Ehse, 2009). Studi condotti in fibroblasti embrionali di topo (cellule MEF) KO o doppi KO per Oma1 e Yme1 ($Oma1^{-/-}$, $Yme1^{-/-}$ e $Oma1^{-/-}Yme1^{-/-}$) dimostrano che l'isoforma L-Opa1 è sufficiente per il processo di fusione mitocondriale. Inoltre L-Opa1 ha il ruolo di preservare la morfologia delle creste e conferire alle cellule resistenza all'apoptosi. L'isoforma S-Opa1 sembra invece coinvolta nel processo di fissione mitocondriale, in quanto colocalizza nei punti di costrizione della OMM con Drp1 (Anand, 2014).

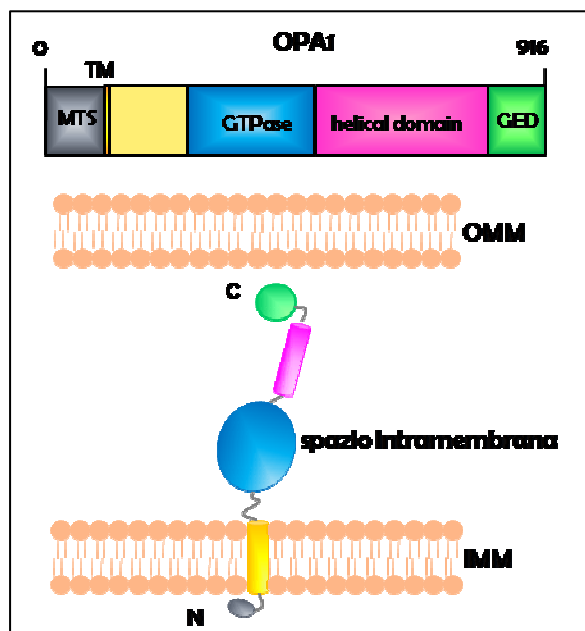


Fig. 12: *Struttura di Optic atrophy 1.* In alto, la rappresentazione schematica del gene OPA1, che mette in evidenza i principali domini conservati. In basso, la struttura proteica di Opa1. Opa1 è una proteina ancorata alla membrana mitocondriale interna (IMM) che protrude verso lo spazio intramembrana (IMS). Presenta quattro domini principali: un segmento transmembrana (TM) per l'ancoraggio in membrana (in giallo), un dominio GTPasico (in azzurro) seguito da una porzione ad α -elica (in fucsia) e un dominio GED (GTPase effector domain) C-terminale (in verde).

La proteina inoltre presenta una sequenza di

localizzazione mitocondriale (MTS) N-terminale che sporge verso la matrice mitocondriale (Knott,2008).

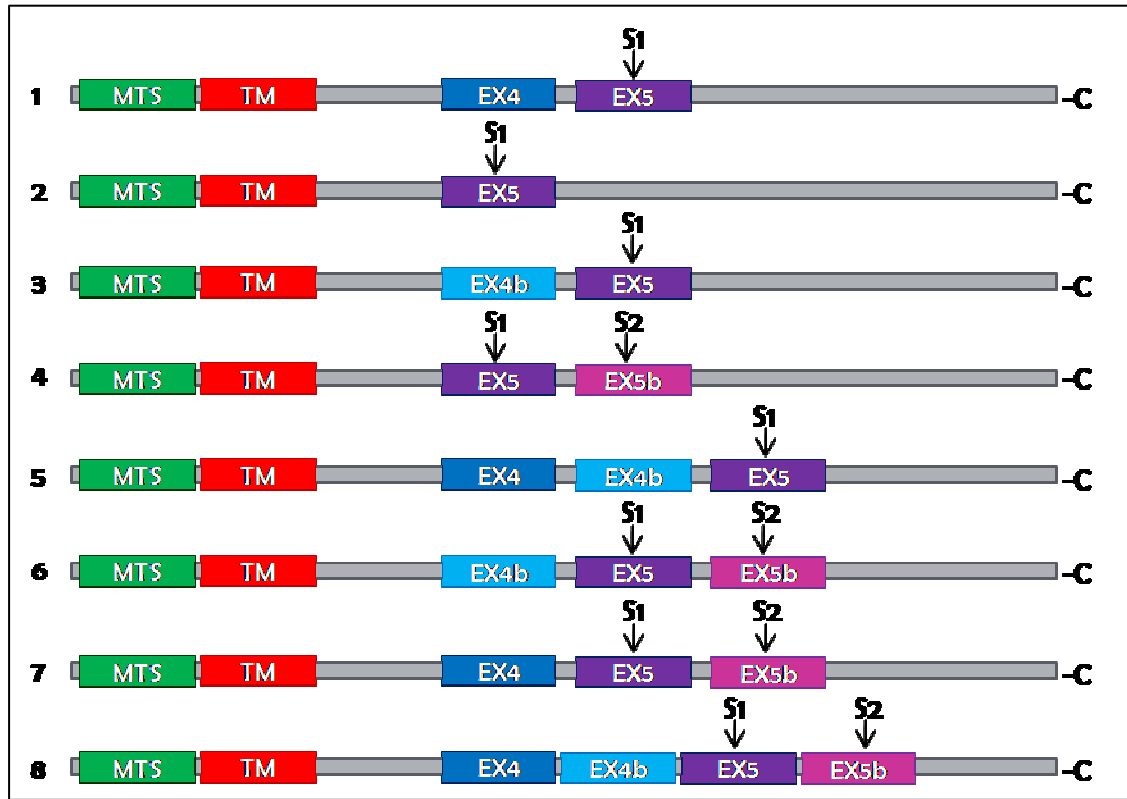


Fig. 13: Rappresentazione schematica delle varianti umane di OPA1. OPA1 nell'uomo presenta 8 diverse isoforme ottenute in seguito a splicing alternativo dell'mRNA livello dell'esone 5 e 5b (indicati con le frecce). Esse infatti differiscono dalla presenza o assenza dell'esone 4, 4b e 5b. Inoltre il taglio proteolitico che porta all'eliminazione del dominio MTS da origine a isoforme lunghe della proteina, mentre il taglio proteolitico a livello dell'esone 5 (S1) e dell'esone 5b (S2) da origine a isoforme corte.

La maggior parte delle isoforme di Opa1 ed i corrispettivi ortologhi sono stati studiati in cellule e tessuti neuronali in condizioni fisiologiche. Per esempio, la down-regolazione di Opa1 blocca il processo di morte neuronale indotto dall'aumento del calcio intracellulare a seguito dell'azione del glutammato sui recettori postsinaptici dell'acido glutammico (recettori NMDA) (Jahani-Asl, 2011). La modulazione dell'espressione di Opa1 e i difetti mitocondriali ad essa associati sono stati riscontrati cellule neuronali di topi modello per il Parkinson e l'Huntington (Kieper, 2010). Opa1 ha un ruolo anche nella morfogenesi mitocondriale in tessuti non neuronali: mutati eterozigoti di

Drosophila mostrano una riduzione della sopravvivenza e un aumento della produzione di ROS (Tang, 2009).

Studi su cellule KO per OPA1 mostrano una severa riduzione della respirazione basale, insensibilità all'aggiunta di disaccoppianti e una diminuzione del consumo di ossigeno mediata dal complesso I, II e IV dell'ETC (Chen, 2005). Questo può essere dovuto ad alterazioni dell'ETC stessa legate alla disorganizzazione della struttura della IMM a seguito della riduzione di Opa1 (Griparic, 2004). Zanna e colleghi infatti hanno osservato un'interazione fisica tra Opa1 e i complessi I, II e III dell'ETC (Zanna, 2008). Recentemente è stato ipotizzato che la sovraespressione di Opa1 causa il miglioramento del fenotipo in due modelli malattia di topo che presentano difetti della ETC (Civiletto, 2015).

Infine, Opa1 svolge anche un ruolo fondamentale nel rimodellamento delle creste. Studi dimostrano che cellule KO per OPA1 presentano una disorganizzazione della struttura delle creste e attivazione dei processi morte cellulare programmata. Opa1 infatti sembra essere coinvolto nella mobilitazione del CytC dalla matrice mitocondriale e nella regolazione della morfologia delle creste grazie alla formazione di complessi oligomerici ad elevato peso molecolare (Scorrano, 2009).

3.3 Proteine coinvolte nel processo di fissione mitocondriale

3.3.1. Dnm1/Dlp1/Drp1

Dynamamin-Related-Protein (Drp1) è una proteina solubile ed ubiquitaria, conservata negli eucarioti e nelle piante, che sembra avere ruolo principale nei processi di fissione mitocondriale (Roi, 2015). Drp1 è presente in abbondanza nel citosol ma è stata identificata anche sulla OMM, nei siti di costrizione nei quali avviene la fissione mitocondriale (Smirnova, 2001). Drp1 è una proteina della famiglia delle dinamine caratterizzata da un dominio GTPasico N-terminale, una regione centrale ad α -elica e un GTPase effector domain (GED) C-terminale (Fig. 14). Numerosi studi biochimici e strutturali hanno mostrato la capacità di oligomerizzare sulla membrana mitocondriale formando strutture a spirale che portano ad un restringimento della membrana stessa e, inseguito all'idrolisi dell'GTP, fissione (Hinshaw, 1999). Il reclutamento sulla membrana del mitocondrio, l'assemblaggio, l'attività e la stabilità di Drp1 sono regolati da numerose modificazioni post-traduzionali, quali fosforilazioni, S-nitrosilazioni, ubiquitinazioni, SUMOilazioni e acetilazioni (Wilson, 2013), che modulano il processo di fissione in risposta a stimoli cellulari. Ad esempio, Drp1 viene reclutato sulla membrana mitocondriale in seguito a fosforilazione mediata dalla chinasi CDK1, con

conseguente frammentazione ed entrata della cellula nella fase di divisione cellulare (Kashatus, 2011).

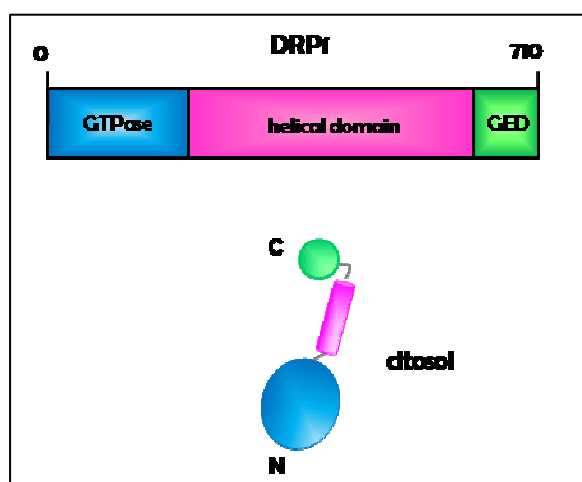


Fig. 14: Struttura di Dynamin-related-protein 1. In alto, la rappresentazione schematica del gene DRP1, che mette in evidenza i principali domini conservati. In basso la struttura proteica di Drp1. Drp1 è una proteina citosolica caratterizzata dalle presenza di un dominio GTPasico N-terminale importante per la sua funzione (azzurro), un dominio ad α -elica

(in fucsia) e un dominio GED (GTPase effector domain) C-terminale (in verde) (Knott,2008).

L'inattivazione di DRP1 in seguito a KO, KD o espressione di mutati dominanti negativi causa un aumento della lunghezza dei mitocondri e delle interconnessioni nel network mitocondriale in diverse linee cellulari (Smirnova, 2001). KD di Drp1 porta a difetti cellulari, in particolare alla riduzione della fosforilazione ossidativa e all'inibizione della proliferazione cellulare (Bernard, 2007; Parone, 2008) e il KO in topo mette in evidenza come i meccanismi di fissione mediati da Drp1 siano essenziali per lo sviluppo dell'embrione (Wakabayashi, 2009).

Drp1 sembra essere necessario anche per la morfologia, la distribuzione e il mantenimento del mtDNA in quanto vi è una stretta correlazione tra nucleoidi e i punti di fissione mitocondriale (Ishihara, 2015). Nonostante questo, la delezione di DNM1⁺ in lievito non causa alterazione dei livelli di mtDNA (Otsuga, 1998).

Drp1 ha inoltre un ruolo nella segregazione di mitocondri non funzionanti che andranno incontro a mitofagia (Twig, 2008). Il legame tra meccanismo di fissione e mitofagia è stato descritto in lievito: le proteine che costituiscono l'autofagosoma legano e reclutano Dnm1 promuovendo la fissione, necessaria per la degradazione del mitocondrio (Mao, 2013). Nonostante questo, il meccanismo che sta alla base di tale processo non è ancora del tutto chiaro.

Drp1 sembra avere un ruolo non ancora chiaro nell'apoptosi, anche se ci sono ipotesi contrastanti a riguardo. Diversi studi hanno messo in evidenza che la permeabilizzazione della OMM, in seguito all'attivazione dell'apoptosi, ha come

conseguenza la frammentazione mitocondriale (Arnoult, 2007); al contrario, altri propongono che la fissione sia necessaria per attivazione dell'apoptosi (Lee, 2004). Infine, studi su cellule MEF prive di Drp1 sembrano confermare il suo ruolo indispensabile nella permeabilizzazione della OMM durante l'apoptosi, facilitandone il processo (Ishihara, 2009).

3.3.2. Fis1p/hFis1

Studi in *S. cerevisiae* identificano per la prima volta Mitochondrial fission protein 1 (Fis1p), una proteina transmembrana di 17 kDa distribuita uniformemente sulla OMM. Fis1p presenta un dominio N-terminale esposto al citoplasma che da origine ad un tetratricopeptide (TPR-like fold), un dominio transmembrana e un dominio C-terminale costituito da una breve sequenza amminoacidica che protrude nello IMS necessario per la localizzazione in membrana (Stojanovski, 2004; James, 2003). È stato ipotizzato che Fis1p abbia un ruolo fondamentale nei processi di fissione mitocondriale: esso infatti funge da recettore per Dnm1 e, grazie alla presenza di due molecole adattatrici, Mdv1 o Caf4, media la fissione (Mozdy, 2000). Successivamente è stato identificato l'omologo del gene FIS1p anche nell'uomo, hFIS1, che presenta il 30% di omologia nella sequenza proteica e il 23% in quella nucleotidica (Lai, 2000). Nonostante ci siano evidenze anche nei mammiferi della capacità di hFis1 di reclutare Drp1, il suo ruolo resta ancora poco chiaro. Primi studi mostrano frammentazione mitocondriale in cellule COS-7 che sovraesprimono hFis1 e aumento delle interconnessioni tra mitocondri in cellule in cui hFis1 è down-regolato con siRNAi dimostrando così la funzione di scissione mitocondriale nei processi di fissione (Stojanovski, 2004). Nonostante questo, è stato osservato che l'inibizione di hFis1 non blocca il reclutamento di Drp1 in membrana (Lee, 2004) e tale meccanismo sembra essere tipo- cellulare dipendente (Otera, 2010). È stato perciò ipotizzato che hFis1 abbia un ruolo essenziale nella fissione mitocondriale solo in specifici tipi cellulari e in altre cellule invece il ruolo dominante lo abbiano altre proteine coinvolte nella fissione come Mff. Inoltre è stato ipotizzato che hFis1 sia una proteina bifunzionale che regola in modo indipendente fissione e apoptosi (Alirol 2006).

3.3.3. Mff

Mitochondrial fission factor (Mff) è una proteina coinvolta nel processo di fissione mitocondriale. È ancorata alla OMM mediante il dominio C-terminale costituito da amminoacidi idrofobici ed è presente anche sulla membrana dei perossisomi. Inoltre

possiede un dominio N-terminale caratterizzato dalla presenza di amminoacidi conservati e un dominio ad α -elica necessario per l'interazione con altre proteine, come Drp1. Mff è stato identificato mediante screening di siRNA in *Drosophila m.*: il silenziamento di Mff porta alla formazione di un network di mitocondri allungati simile a quello osservato silenziando hFis1. Questo suggerisce, data la localizzazione e la funzione che svolgono queste proteine, che hFis e Mff appartengano allo stesso pathway (Gandre-Babbek, 2008). Studi successivi hanno messo in evidenza differenze funzionali di Mff rispetto hFis1. Analizzando la distribuzione di Drp1 in cellule è stato dimostrato che una riduzione dell'espressione di Mff aumenta notevolmente il pool citoplasmatico di Drp1, che non risulta paragonabile ai controlli e a cellule in cui hFis1 è down-regolato. Questo dimostra che Mff è necessario per il reclutamento in membrana di Drp1 durante il processo di fissione mitocondriale (Otera, 2010).

3.3.4. MiD49 e MiD51

Mitochondrial dynamics protein di 49 kDa e di 52 kDa (MiD49 e MiD51), chiamate anche mitochondria elongation factor 1 (rispettivamente Mief1 e Mief2), sono proteine simili tra loro, ancorate alla OMM mediante un unico segmento transmembrana e caratterizzate da un dominio N-terminale che protrude nel citoplasma. MiD49 e MiD51 sembrano essere coinvolte nel processo di fissione mitocondriale anche se evidenze sperimentali mostrano controversie nel loro meccanismo d'azione. Alcuni studi dimostrano che la riduzione dell'espressione di entrambe le proteine causa un aumento delle dimensioni dei mitocondri e una riduzione del reclutamento di Drp1 in membrana (Palmer, 2011) supportando l'idea del loro ruolo nella fissione. Altre analisi invece mostrano che la sovraespressione di MiD49 o MiD51 causa fusione mitocondriale e che la down-regolazione di MiD51 causa frammentazione concludendo quindi che MiD51 abbia un ruolo nell'inibizione del meccanismo fissione mitocondriale (Zhao, 2011). Nel 2013 Losón e colleghi hanno confermato l'ipotesi di Palmer, dimostrando che le proteine MiD sono coinvolte positivamente nel processo di fissione e che, in specifici tipi cellulari e/o particolari condizioni, possono agire indipendentemente dalla presenza di hFis1 e Mff (Losón, 2013).

3.3.5. Gadp1

Ganglioside induced differentiation associated protein 1 è una proteina localizzata sulla OMM espressa principalmente nei neuroni sensoriali e motori, ma anche a bassi livelli nelle cellule di Schwann e nei fibroblasti della pelle (Pedrola, 2008; Noack, 2012). È una

proteina di 43 kDa costituita da un unico dominio che contiene due regioni GST separate da un loop ad α -elica importante per le interazioni proteina-proteina e una porzione C-terminale idrofobica necessaria all'ancoraggio in membrana (Huber, 2013). Gdap1 interagisce con le proteine coinvolte nei processi di fusione e fissione mitocondriale e sembra essere un modulatore indiretto nei meccanismi di dinamica mitocondriale. Infatti la sovraespressione di Gdap1 causa frammentazione mitocondriale mediata da Dpr1, mentre una riduzione dei livelli di espressione nei neuroni causa allungamento dei mitocondri nel soma (Niemann, 2005).

Gdap1 interagisce con proteine coinvolte nel posizionamento e nella mobilitazione degli organelli: l'aumento o la riduzione di espressione di Gdap1 altera il movimento, la distribuzione e la localizzazione mitocondriale (Pla-Martin, 2013). Altri studi hanno messo evidenza il ruolo di Gdap1 nel controllo del pool di glutatione (GST) cellulare: in linee cellulari resistenti allo stress ossidativo Gdap1 è sovraespresso; in linee cellulari sensibili a stress ossidativo la sovraespressione di Gdap1 aumenta i livelli di GST, mentre in cellule dove Gdap1 è downregolato la produzione di GST viene ridotta (Noack, 2012).

3.4. Meccanismo molecolare alla base della fusione mitocondriale

La funzione principale delle proteine appartenenti alla famiglia delle GTPase dynamin-related protein (DRP) è quella di regolare la dinamica di membrana in svariati processi cellulari (Praefcke, 2004). Proteine come la dinamina e mitochondrial division dynamin (Dnm1) di lievito sono state altamente caratterizzate ed entrambe promuovono la scissione della membrana grazie all'utilizzo di energia generata durante l'autoassemblaggio inseguito all'idrolisi del GTP (Niemann, 2001; Hinshaw, 2000). Gli altri membri della famiglia delle dinamine sono invece coinvolti nel rimodellamento di altri tipi di membrana (Danino, 2001). Due di questi sono Fzo1 e Mgm1, DRPs essenziali per la fusione rispettivamente della OMM e della IMM. Altri eventi di fusione cellulare avvengono grazie ad altre proteine come le proteine SNARE, le quali interagiscono in trans con conseguente avvicinamento di due doppi strati fosfolipidici, destabilizzazione delle membrane e fusione delle stesse (Jahn, 2006). Dunque Fzo1 e Mgm1 agiscono con un meccanismo nuovo ed esclusivo per i mitocondri, rispecchiando la loro origine endosimbiontica.

La proteina essenziale nei processi di fusione della OMM è Fzo. Essa è altamente conservata e presenta due ortologhi nei mammiferi, Mfn1 e Mfn2 (Fig. 15A). Come le altre proteine della famiglia delle DRP, l'attività GTPasica ed il corretto assemblaggio della proteina sono necessari a Fzo1 per svolgere la propria funzione. Mutazioni nel dominio GTPasico N-terminale o nei domini HR C-terminali causano l'inibizione della fusione con conseguente frammentazione mitocondriale, perdita di mtDNA ed alterazione dell'ETC (Hermann, 1998, Ishihara, 2004; Griffin, 2006; Santel, 2001). Studi *in vitro* in lievito dimostrano che Fzo1 interagisce *in trans* con altre proteine Fzo1 formando omodimeri e allineando le OMM per la successiva fusione (Meeusen, 2004). Analogamente è stato ipotizzato che Mfn1 e Mfn2 formano complessi omo- ed eteroligomerici *in trans* che permettono la fusione delle membrane grazie all'interazione delle regioni α -elica presenti nei domini HR di proteine localizzate sulla membrana di mitocondri adiacenti (Low, 2006) (Fig. 15C).

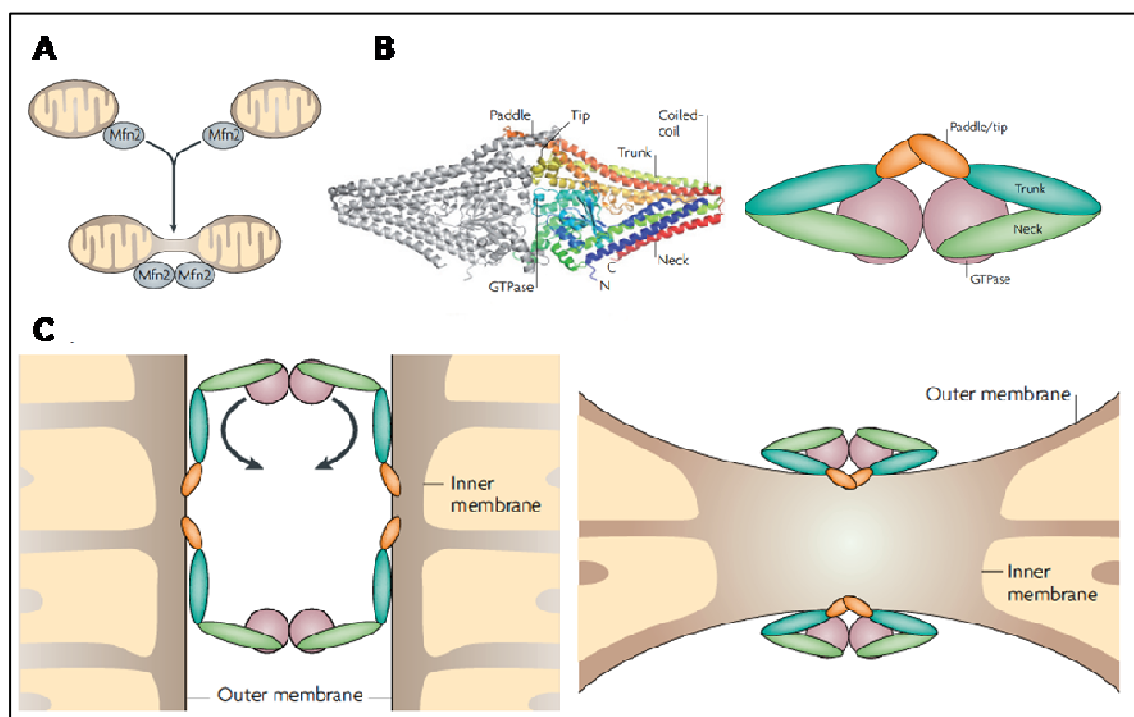


Fig. 15: Fusione mitocondriale. A) Rappresentazione schematica del processo di fusione delle membrane esterne mitocondriali: mitofusine di mitocondri adiacenti interagiscono tra loro favorendo l'avvicinamento delle OMM e la loro fusione. B) A sinistra la struttura proteica di un omodimero di una dynamin-like-protein batterica (BDLP): una molecola colorata e mette in evidenza i vari domini proteici mentre l'altra è in grigio. A destra la struttura di un omodomero di mitofusina, molto simile alla struttura batterica. Anche in questo caso sono messi in evidenza i domini proteici: domini

GTPasici (in rosa) i domini idrofobici (in verde chiaro e scuro) e i domini transmembrana (in arancio). C) Modello molecolare proposto per descrivere il processo di fusione mitocondriale mediato da mitofusina. Dimeri di mitofusina interagiscono con dimeri di mitocondri adiacenti e, in seguito al legame del GTP, le proteine subiscono un cambiamento conformazionale che porta all'avvicinamento delle membrane e alla loro successiva fusione (Knott, 2008).

3.5. Meccanismo molecolare alla base della fissione mitocondriale

In lievito, il processo di fissione mitocondriale è guidato da Dnm1, omologo di Drp1 negli eucarioti. Si tratta di una proteina che appartiene alla famiglia delle DRP e, come Fzo1, Mfn1 e Mfn2, deve autoassemblarsi per svolgere la propria funzione (Praefcke, 2004).

A differenza di Dnm1, che forma strutture che localizzano nel citoplasma e sulla superficie mitocondriale, Drp1 è altamente espresso nel citosol e solo una piccola frazione assembla sul mitocondrio al momento della fissione (Smirnova, 2001; Labrousse, 1999). Questi complessi sono altamente dinamici e vi è un continuo scambio di subunità tra il citosol e la membrana (Wasiak, 2007) (Fig. 16A).

L'oligomerizzazione di Dnm1/Drp1 è necessaria per la sua funzione (Jensen, 2000). Una completa caratterizzazione strutturale di Dnm1 ha permesso chiarire la relazione tra l'assemblaggio dei complessi e la fissione mitocondriale (Ingerman, 2005). In seguito al legame con il GTP e all'idrolisi in GDP, Dnm1 assembla in strutture elicoidali estese molto diverse rispetto a quelle originarie, prima del legame con il nucleotide. Rispetto alle eliche formate dalla dinamina, Dnm1 da origine a eliche con diametro maggiore, equivalente al diametro dei mitocondri nel sito di costrizione, in cui avverrà poi la rottura. Dnm1 può anche assemblarsi *in vitro* su liposomi artificialmente costretti, formando tubuli con diametro paragonabile a quello del sito di costrizione mitocondriale *in vivo*. Questi studi affermano che il GTP guida oligomerizzazione di Dnm1 sulla membrana dei mitocondri. Mutanti di DNM1 nel dominio GTPasico non assemblano *in vitro* e non provocano fissione *in vivo* (Naylor, 2006): questo supporta l'ipotesi che il legame con il GTP sia necessario per la formazione della struttura ad elica mentre l'idrolisi lo sia fondamentale per il processo di fissione. Se infatti il dominio GTPasico lega analoghi del GTP non idrolizzabili come GMPPCP, la struttura elicoidale si contorce e si disassembla (Ingerman, 2005): il cambio conformazionale associato all'idrolisi può essere perciò sfruttato per facilitare la fissione.

Il modello che descrive i meccanismi di fissione suggerisce la suddivisione in tre fasi principali del processo: il riconoscimento del mitocondrio che deve andare incontro a fissione, il legame del GTP al dominio GTPasico di Dnm1/Drp1ed infine la scissione. Sebbene Dnm1/Drp1 sia considerata la proteina che maggiormente regola la fissione, *in vivo* essa non è sufficiente perché il processo avvenga. Sono state identificate infatti altre proteine che partecipano o facilitano il meccanismo di fissione mitocondriale nelle varie fasi come ad esempio Fis1 negli eucarioti (Mozdy, 2000).

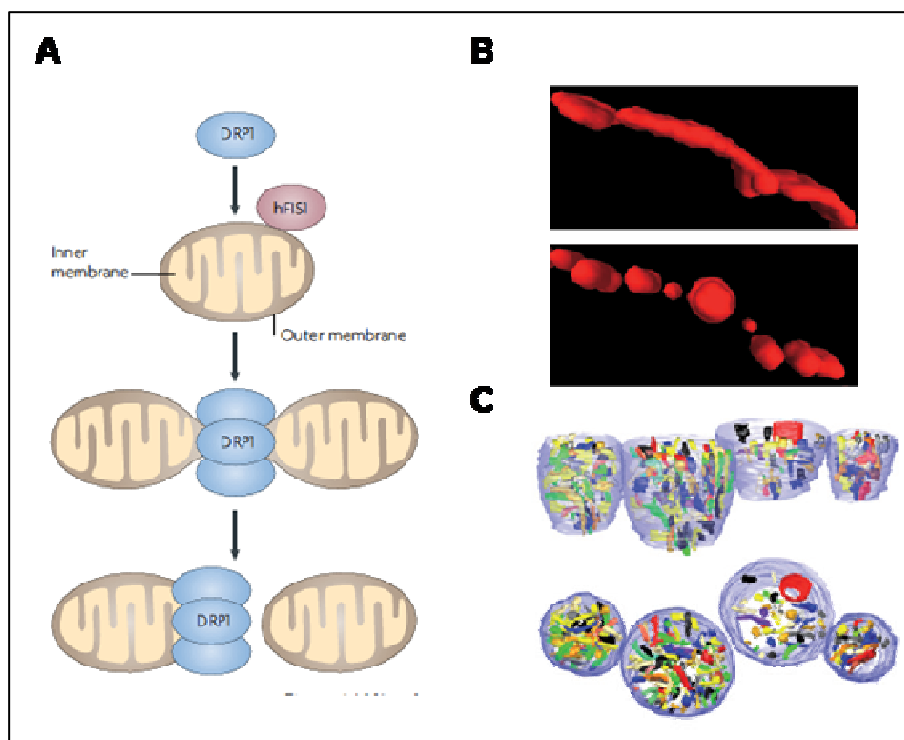


Fig. 16: Fissione mitocondriale. A) *Dynamin-related-protein 1 (Drp1)* è una proteina citoplasmatica in grado di legarsi alla OMM e mediare il processo di fissione mitocondriale. Tale meccanismo avviene in seguito a interazione diretta con *Fission 1 (Fis1)*, proteina transmembrana localizzata nella OMM, che funge da recettore per *Drp1*. *Drp1* si assembla sulla OMM formando costrizioni che portano alla scissione del mitocondrio. B) Immagini di microscopia a fluorescenza 3D di mitocondri. Le cellule esprimono *DsRed-Mito* che permette di visualizzare i mitocondri in rosso. L'immagine in alto mostra mitocondri allungati di neuroni di controllo, mentre l'immagine in basso mostra mitocondri frammentati di neuroni esposti a stress. C) Ricostruzione 3D di mitocondri frammentati ottenuta da immagini di microscopia TEM. La membrana esterna è visibile in blu, mentre le creste sono colorate con colori differenti. Le creste di mitocondri sottoposti a stress risultano chiaramente frammentate (Knott, 2008).

3.6. Dinamicità mitocondriale e patologie associate

Parecchie malattie neurodegenerative come il Parkinson, l'Alzheimer e l'Huntington sono associate a molteplici difetti mitocondriali che includono alterazioni della fosforilazione ossidativa, produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e difetti nella mobilità mitocondriale, collegate alle dinamiche mitocondriali e ai processi di mitofagia per l'eliminazione dei mitocondri mal funzionanti (Burte, 2015; Ryan 2015). In particolare, due gruppi di neuropatie, l'atrofia ottica dominante (DOA) (Delettre, 2000) e le neuropatie di Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Murphy, 2012), sono direttamente causate da mutazioni in geni coinvolti nei processi di fusione e fissione mitocondriale. Infine, indirette alterazioni della morfologia, della mobilità e della distribuzione mitocondriale sono state osservate in patologie che presentano mutazioni nei geni che codificano per le m-AAA proteasi, che causano paraplegie spastiche ereditarie (HSP) e atassie (Quiros, 2015).

3.6.1. Neuropatie di Charcot-Marie-Tooth

Le neuropatie Charcot-Marie-Tooth (CMT) sono un gruppo di patologie ereditarie che riguardano i nervi periferici e sono caratterizzate da lenta e progressiva debolezza muscolare, atrofia muscolare e perdita sensoriale del tatto. La frequenza con cui queste patologie si presentano nella popolazione è di 1:2500 e si possono suddividere in due gruppi principali, di tipo 1 (CMT1) e di tipo 2 (CMT2). CMT1 è una forma demielinizante che si manifesta nell'80% dei casi e porta ad una riduzione della velocità di conduzione dell'impulso, mentre CMT2 è una forma assonale che si verifica solo nel 20% dei casi in cui si osserva degenerazione delle fibre nervose. Nel 2004 Zuchner e colleghi hanno mappato la mutazione implicata nella patologia: il gene *MFN2* presentava mutazioni *missense* a livello del dominio GTPasico, ed esso è stato identificato come gene responsabile della neuropatia CMT2A (Zuchner, 2004). Un'altra classe di mutazioni in *MFN2* causa, oltre alla neurodegenerazione periferica, perdita della vista e atrofia ottica spesso associate fenotipicamente alla DOA plus (DOA⁺) e a mutazioni in *OPA1* (Rouzier, 2012). Le similitudini riscontrate in CMT2A e DOA sono dovute al fatto che entrambi i geni coinvolti codificano per proteine responsabili del processo di fusione mitocondriale, rispettivamente *MFN2* e *OPA1*. Il fatto che *Mfn2* sia espressa in modo ubiquitario mentre i sintomi siano ristretti solo ai neuroni indica che *Mfn2* esercita una funzione specifica nel sistema nervoso e che probabilmente in tutti gli altri tessuti si innesca un meccanismo di compensazione. Questa ipotesi è supportata da studi che dimostrano che l'espressione di *Mfn1*, proteina che svolge funzioni simili a

Mfn2, è più bassa nei nervi periferici rispetto ad altri tessuti e quindi non sia in grado di compensare la mancanza di Mfn2 (Kawalec, 2014).

Gli alleli mutati nel gene di MFN2 sono stati largamente studiati. L'analizzando del numero di copie di mtDNA di pazienti che presentano mutazioni nel gene MFN2 si è visto che questi presentano un aumento del numero di copie rispetto al controllo, caratteristica comune a numerose miopatie mitocondriali (Sitarz, 2012). Fibroblasti di pazienti con mutazioni in MFN2 con fenotipo DOA⁺ mostrano ridotti livelli di Mfn2, alterazione della catena respiratoria e frammentazione mitocondriale, mentre fibroblasti di pazienti con CMT2A contengono livelli normali di Mfn2 e mtDNA e non presentano alterazioni della morfologia e della capacità respiratoria (Rouzier 2012, Amiott, 2008). Infine, cellule staminali pluripotenti di pazienti indotte a differenziare a motoneuroni mostrano anomalie del trafficking mitocondriale e nelle proprietà elettrofisiologiche (Saporta, 2015).

La sovraespressione di mutanti di MFN2 in neuroni in coltura causa una modifica della distribuzione mitocondriale e promuove la degenerazione assonale (Misko, 2012). Ciò non accade in cellule MEF dove invece non si osservano notevoli differenze nella morfologia mitocondriale probabilmente associate alla presenza di Mfn1 (Detmer, 2007).

Per determinare le cause della CMT2A non è sufficiente avvalersi di un sistema cellulare semplice come le cellule MEF ma è necessario utilizzare sistemi più complessi o modelli animali. Dato l'elevato grado di conservazione della sequenza genica e proteica di Mfn2 è stato possibile studiare la neuropatia CMT2A in modelli come Zebrafish e *Drosophila m.* determinando che il difetto nella fusione della OMM non è sufficiente allo sviluppo della patologia (Chapman, 2013; Vettori, 2011).

3.6.2. Atrofia Ottica Autosomica Dominante

Mutazioni del gene OPA1 sono associate ad Atrofia Ottica Autosomica Dominante (ADOA), la più comune forma di neuropatia ottica ereditaria con frequenza di 1:50000 individui (Delettre, 2000). L'individuazione di Opa1, come gene coinvolto nella malattia, è stata possibile grazie a screening a livello cromosomico (Alexander, 2000) che hanno permesso di identificare più di 200 mutazioni patologiche come mutazioni missenso, mutazioni che causano frameshift, mutazioni nonsense e delezioni (rispettivamente nel 26%, 16%, 14%, 7% dei casi) (Ferre, 2015). Le mutazioni sono diffuse lungo tutta la sequenza genica in particolare a livello del dominio GTPasico (31%) e del dominio centrale (34%), mentre non sono presenti a livello dell'esone 4 e 6. Delezioni

sono state invece individuate nel dominio GED. L'aploinsufficienza è in meccanismo patologico che caratterizza lo sviluppo di DOA in casi in cui il prodotto genico sia una proteina tronca o quando le mutazioni alterano il frame (Marchbank, 2002; Pesch, 2001). Mutazioni a livello del dominio GTPasico possono essere mutazioni dominanti negative, cioè mutazioni in cui il prodotto codificato dall'allele mutato interferisce con la funzione della proteina wild type (Olichon, 2007) .

ADOA è una malattia della retina caratterizzata da degenerazione delle cellule del ganglio ottico (RGC) con successiva atrofia del nervo ottico e si manifesta, dal punto di vista clinico, con riduzione della capacità visiva, tritanopia (confusione nella distinzione dei colori blu e giallo) e perdita del campo visivo centrale (Ferré, 2005). Più del 20% dei pazienti con mutazioni in OPA1 sviluppano anche complicazioni neurologiche extraoculari (la sindrome DOA⁺) che includono sordità, atassia, neuropatie periferiche, miopia e progressiva oftalmoplegia (Yu-Wai-Man, 2010). L'inattivazione di OPA1 porta a degenerazione delle cellule RGC che risultano più suscettibili al danno rispetto le altre cellule del sistema nervoso e presentano peculiari caratteristiche. Esse sono particolarmente esposte alla luce che può facilitare la generazione di ROS e hanno bisogno di alti livelli di energia per svolgere correttamente la loro funzione; sono caratterizzate da una particolare architettura, parte del nervo ottico non è mielinizzato ed infine mostrano alterazione della distribuzione mitocondriale fisiologica (Belenguer, 2013).

Una recente pubblicazione riporta l'associazione tra mutazioni in OPA1 e sviluppo di Parkinson ipotizzando un legame tra alterazione delle dinamiche mitocondriali e patologie neurodegenerative collegate all'età (Carelli, 2015).

3.6.3. DRP1 e morte cellulare dei neuroni

Drp1 è altamente espresso nel cervello e questo suggerisce che mutazioni a livello della sequenza genica causano danneggiamento neuronale nell'uomo. Oltre a svolgere un ruolo fondamentale nello sviluppo del cervello e nella maturazione neuronale, Drp1 è responsabile della sopravvivenza dei neuroni neoformati inseguito a mitosi. Cellule del Pukinje post-mitotiche di topo prive di Drp1 (DRP1^{-/-}) accumulano danni dovuti allo stress ossidativo, marcatori della mitofagia, difetti nella respirazione e degenerano gradatamente dopo 6 mesi, con conseguente sviluppo di difetti nella coordinazione dei movimenti (Kageyama, 2012). Inoltre, anche le modificazioni post-traduzionali di Drp1 modulano la morte delle cellule neuronali. La fosforilazione di Drp1 mediata da PKA in cellule PC12 (cellule di feocromocitoma di ratto) inibisce la frammentazione

mitocondriale e l'apoptosi (Cribbs, 2007), mentre la fosfatasi 2A, che regola l'attività di Drp1, modula la suscettibilità di queste cellule alla morte in seguito ad ischemia e danno citotossico (Dagda, 2008). Inoltre, durante il danno neuronale, lo stress ossidativo può indurre nitrosilazione e fosforilazione di Drp1, responsabili dell'attivazione della proteina (Bossy 2010). È stato dimostrato quindi che l'inibizione di Drp1 mediata da Mdivi-1 conferisce neuroprotezione sia *in vitro* sia *in vivo* (Cassidy-Stone, 2008; Grohm, 2012; Park, 2011).

Nonostante il ruolo di Drp1 nei processi di morte neuronale, mutazioni di Drp1 si sono verificate in un unico caso clinico: la morte di un bambino a 37 giorni dalla nascita che presentava con una mutazione dominante negativa in DRP1 e riportava una serie di anomalie tra cui lo sviluppo ridotto del cervello e atrofia ottica (Waterham, 2007).

3.7. Dinamicità mitocondriale e trasporto mitocondriale assonale

Un altro aspetto della dinamica mitocondriale, oltre ai processi di fusione e fissione, è la motilità dei mitocondri, che deve essere altamente regolata soprattutto in cellule come i neuroni (Hollenbeck, 2005). I neuroni nel sistema nervoso sono cellule polarizzate e costituite da tre domini che si distinguono per la diversa funzione: il soma o corpo cellulare, un assone di lunghezza variabile e una serie di dendriti altamente ramificati. Mentre il soma e i dendriti ricevono e processano le informazioni, l'assone le trasmette generando impulsi elettrici. I mitocondri vengono sintetizzati nel corpo cellulare e trasportati lungo l'assone in base al fabbisogno energetico (Hollenbeck, 1996). Nei neuroni maturi, circa il 20-30% dei mitocondri è mobile: a partire dal corpo cellulare i mitocondri o arrivano direttamente alla terminazione sinaptica o, lungo il percorso, si fermano e ricominciano a muoversi al fine di raggiungere la NMJ (Chen, 2008). Infatti esperimenti *in vitro* e *in vivo* mostrano che i movimenti dei mitocondri lungo l'assone sono complessi e variabili: i mitocondri possono muoversi in modo bidirezionale, fermarsi, cambiare direzione e accumularsi in punti specifici della cellula. Anche la velocità di movimento è variabile ed è compresa tra 0,32-0,91 $\mu\text{m/s}$ (Macaskill, 2010). I mitocondri, si muovono lungo gli assoni grazie ad una serie di proteine di trasporto ed è necessario che questo processo sia altamente controllato affinché essi si distribuiscano nella cellula o si accumulino in specifiche zone subcellulari, come ad esempio nelle terminazioni sinaptiche dove è richiesta energia per la liberazione dei neurotrasmettitori e la trasmissione dell'impulso elettrico (Rowland, 2000).

All'interno dei neuroni i mitocondri si muovono: in particolare nel corpo cellulare questi organelli traslocano legandosi a filamenti di actina mentre lungo l'assone sfruttano i

microtubuli. Essi possono essere attivamente trasportati in senso anterogrado (dal soma ai dendriti) e retrogrado (dai dendriti al soma) da proteine motore ATP-dipendenti (MT-based motor protein): rispettivamente le proteine della superfamiglia delle chinesine (KIFs) e le dineine citoplasmatiche. Queste mediano il trasporto dei mitocondri per lunghe distanze, ma anche quello di altri organelli membranosi e proteine sfruttando l'idrolisi dell'ATP (Fig. 17).

Le proteine KIF5, responsabili del trasporto anterogrado, sono presenti nei mammiferi in tre isoforme: KIF5A e KIF5C, che sono espresse solo nei neuroni e KIF5B, espressa in modo ubiquitario (Hirokawa, 2010). La regione N-terminale delle proteine KIF5 consiste nel dominio motore ATPasico mentre la porzione C-terminale è responsabile del legame con il mitocondrio, che non avviene in modo diretto ma grazie alla presenza di proteine adattatrici. Una riduzione di espressione delle proteine KIF5 causa un'alterazione della distribuzione mitocondriale in assoni lunghi (Cai, 2005). Studi in *Drosophila* in live hanno dimostrato che mutazioni nel gene che codifica per la chinesina a catena pesante (*khc*) provocano difetti nel trasporto dei mitocondri e una variazione nella distribuzione mitocondriale nei motoneuroni (Hurd, 1996). Altri studi in topo evidenziano anche, oltre ai difetti nel trasporto, accumulo di mitocondri nelle zone perinucleari dei corpi cellulari (Karle, 2012).

Le dineine citoplasmatiche sono proteine responsabile del trasporto retrogrado mitocondriale nell'assone. Esse contengono subunità multiple che includono due catene pesanti (DHC), catene leggere (DLC) catalitiche, parecchi intermedi (DIC) e intermedi leggeri, che mediano il legame al cargo o l'attività motore. La regione C-terminale DHC è il dominio motore necessario per il movimento della proteina che, insieme alla proteine adattatrici dinactina media il trasporto retrogrado in *Drosophila*. Mutazioni in dineina causano una riduzione del trasporto mitocondriale retrogrado, sia in termini di velocità sia in termini di lunghezza percorsa dal mitocondrio (Pilling, 2006). In particolare, è stato osservato che alterazioni nel complesso della dinactina non impedisce il legame delle proteine motore al mitocondrio ma interrompe il trasporto in entrambe le direzioni. Ciò suggerisce che la dinactina sia coinvolta nella regolazione bidirezionale del trasporto mitocondriale assonale (Haghnia, 2007).

Il trasporto mitocondriale e la continua redistribuzione dei mitocondri lungo l'assone è essenziale per il mantenimento dell'integrità assonale e delle normali funzioni della cellula. Studi hanno messo in evidenza come la mancanza di mitocondri a livello delle giunzioni neuromuscolari in *Drosophila* comprometta la trasmissione sinaptica (Stowers, 2002; Guo, 2005; Verstreken, 2005) e come difetti nel trasporto mitocondriale assonale

siano implicati nello sviluppo di disordini neurologici e malattie neurodegenerative (Chan, 2006).

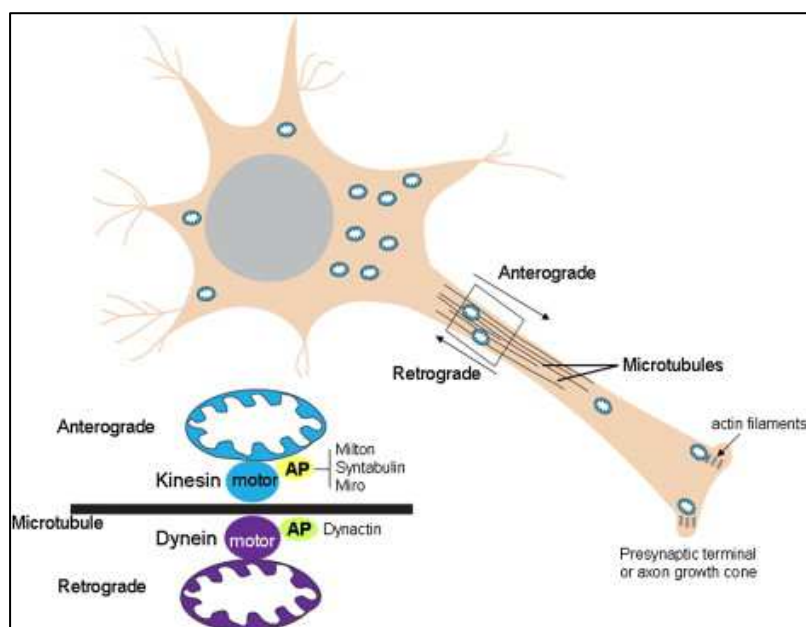


Fig. 17: Meccanismo di trasporto mitocondriale assonale. I microtubuli servono come punto di attacco per i mitocondri per muoversi verso la terminazione sinaptica (trasporto anterogrado) e verso il corpo cellulare (trasporto retrogrado). Le proteine motore ATP-dipendenti che muovono

i mitocondri lungo i microtubuli sono kinesina (anterogrado) e dineina (retrogrado). I mitocondri sono associati ad esse attraverso proteina adattatrici (IAP) che per kinesina includono Milton, Miro e sintabulina mentre per la dineina la dinactina. Nelle terminazioni pre-sinaptiche i mitocondri possono essere ancorati e muoversi lungo filamenti di actina grazie a meccanismi mediati dalla miosina (Mattson, 2008).

3.7.1 Le proteine adattatrici regolano il trasporto mitocondriale

I mitocondri si muovono lungo l'assone grazie alla presenza di e proteine adattatrici e proteine motore che mediano il legame quest'ultime con il mitocondrio. Questi complessi proteici ancorano i mitocondri e ne regolano la distribuzione in risposta a cambiamenti nell'attività neuronale. Milton, la prima proteina adattatrice identificata in *Drosophila*, media il legame tra Miro, proteina localizzata sulla OMM in grado di legare Miro e KIF5 (Glater, 2006). Nei mammiferi sono presenti due ortologhi di Milton, TRAK1 e TRAK2 che hanno ruoli diversi nella regolazione della motilità mitocondriale. TRAK1 lega KIF5 e dineina e orienta i mitocondri nell'assone, mentre TRAK2 predomina nell'interazione dineina-dinactina e media il targeting mitocondriale ai dendriti (Franker, 2013).

Miro è un membro della famiglia delle Rho GTPasi localizzato sulla OMM e funge da recettore per Milton/TRAK1-2, reclutando sulla membrana mitocondriale KIF5

(Klosowiak, 2013). In *Drosophila* mutazioni in dMiro causano un'alterazione del trasporto mitocondriale anterogrado e una deplezione di mitocondri lungo l'assone e in NMJs (Guo, 2005). Nei mammiferi sono presenti due ortologi di dMiro, Miro1 e Miro2, con il 60% di identità nella sequenza genica. La sovraespressione di Miro1 causa un aumento del trafficking mitocondriale in seguito ad un reclutamento maggiore di TRAK e di proteine motore al mitocondrio (Chen, 2013). Altri studi individuano Miro come recettore della dineina ipotizzando quindi il suo ruolo anche nel trasporto assonale retrogrado (Russo, 2009): infatti mutanti nulli di dMiro e neuroni corticali di topo con ridotta espressione di Miro1 (Nguyen, 2014) mostrano un'alterazione del trasporto retrogrado (Fig 18A).

Sintabulina è un'altra proteina adattatrice per KIF5 ancorata alla OMM grazie alla presenza di una porzione transmembrana C-terminale. A differenza di Miro, sintabulina interagisce direttamente con il dominio di legame al mitocondrio di KIF5, inseguito al reclutamento di quest'ultima sulla membrana (Cai, 2005). Ridotta espressione di sintabulina o inibizione del legame sintabulina-KIF5 per la presenza di mutazione nel dominio di legame al cargo di KIF5 in neuroni dell'ippocampo in cultura causa la formazione di agglomerati di mitocondri nel soma e alterazione della distribuzione mitocondriale assonale. Similmente, l'analisi di mobilità mitocondriale in neuroni *in vivo* dimostra che la riduzione di espressione di sintabulina porta ad un blocco del trasporto anterogrado, ma non di quello retrogrado. Queste evidenze consolidano l'ipotesi che sintabulina agisca da proteina adattatrice per KIF5 e abbia un ruolo nel trasporto anterogrado (Fig. 18B).

Oltre alle proteine motore e a quelle adattatrici, ci sono proteine in grado di ancorare i mitocondri in specifiche zone del neurone generando così un pool di mitocondri stazionari che corrisponde circa al un 70% dei mitocondri totali. L'equilibrio tra il pool di mitocondri mobili e stazionari risponde velocemente ai cambiamenti fisiologici del neurone e all'attività in sinapsi e deve essere perciò altamente regolato al fine di diffondere l'ATP nelle aree attive. In particolare, la regolazione della trasmissione sinaptica e la diramazione assonale in dendriti è regolata da mitocondri ancorati in situ che forniscono l'energia necessaria al processo (Courchet, 2013). Sintafilina è una proteina che agisce da "ancora statica" immobilizzando i mitocondri, specificatamente nell'assone, grazie alla presenza di un dominio C-terminale in grado di legare la OMM. Studi su topi KO per sintafilina mostrano un notevole aumento del numero di mitocondri mobili e una riduzione della densità mitocondriale assonale. Al contrario,

una sovraespressione della proteina causa un blocco del trasporto assonale (Chen, 2013; Chen, 2009; Kang, 2008).

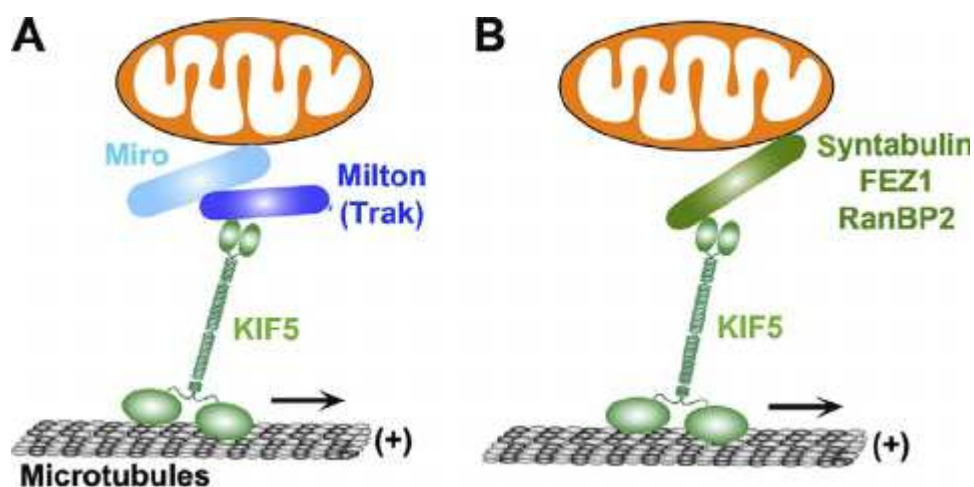


Fig. 18: Regolazione del trasporto mitocondriale e proteine adattatrici. A) Il complesso Miro-Milton (Miro-TRAK) interagisce con la proteina motore KIF5 che guida il trasporto mitocondriale anterogrado. Miro e TRAK possono anche fungere da recettore per la dineina, che media il trasporto retrogrado dei mitocondri. B) Sintabulina è una proteina adattatrice alternativa a Miro e TRAK coinvolta nel trasporto mitocondriale anterogrado (Lin, 2015).

3.7.2. Trasporto mitocondriale e proteine di fusione

Numerose patologie caratterizzate dall'alterazione della morfologia dei mitocondri sono spesso associate a difetti nel trasporto mitocondriale assonale. Studi hanno messo in evidenza, in patologie come CMT2 associata a mutazioni di MFN2, una ridotta mobilità mitocondriale negli assoni di colture di neuroni sensoriali (Baloh, 2007) e un'alterata distribuzione dei mitocondri in motoneuroni di topi transgenici (Detmer, 2008). Nel 2010 il gruppo di Misko ha cercato di definire il ruolo di mitofusina 2 nel trasporto mitocondriale: cellule neuronali di ratto trasdotte con MFN2 mutata (MFN2 R94Q) o Mfn $-/-$ mostrano ridotta velocità di movimento dei mitocondri in entrambe le direzioni e aumento del numero di mitocondri stazionari, cosa che invece non accadeva nei neuroni trasdotti con MFN wild type o con ridotta espressione di Opa1. Questo fa presupporre che Mfn2 sia direttamente coinvolta nel processo di trasporto mitocondriale anche se non è ancora noto il meccanismo e quali siano le altre proteine coinvolte (Misko, 2010).

METODI

1. GENERAZIONE DI LINEE TRANSGENICHE

1.1. Generazione della linea ricombinante Marf RNAi, Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi

Per generare questa linea sono stati incrociati individui Marf RNAi omozigoti e Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi/TM3 . Nella progenie F1 sono stati ottenuti individui eterozigoti per i due trasgeni. Sono state quindi selezionate le femmine , in cui il processo di ricombinazione omologa avviene con maggiore frequenza, e sono state incrociate per la linea W¹¹¹⁸. Successivamente, nella progenie F2 sono stati selezionati gli individui con un colore dell'occhio più intenso, indicatore di probabile ricombinazione. Per ottenere una linea stabile, tali individui sono stati incrociati con un linea bilanciatore per il terzo cromosoma ottenendo così il ricombinante Marf RNAi,Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi/TM6.

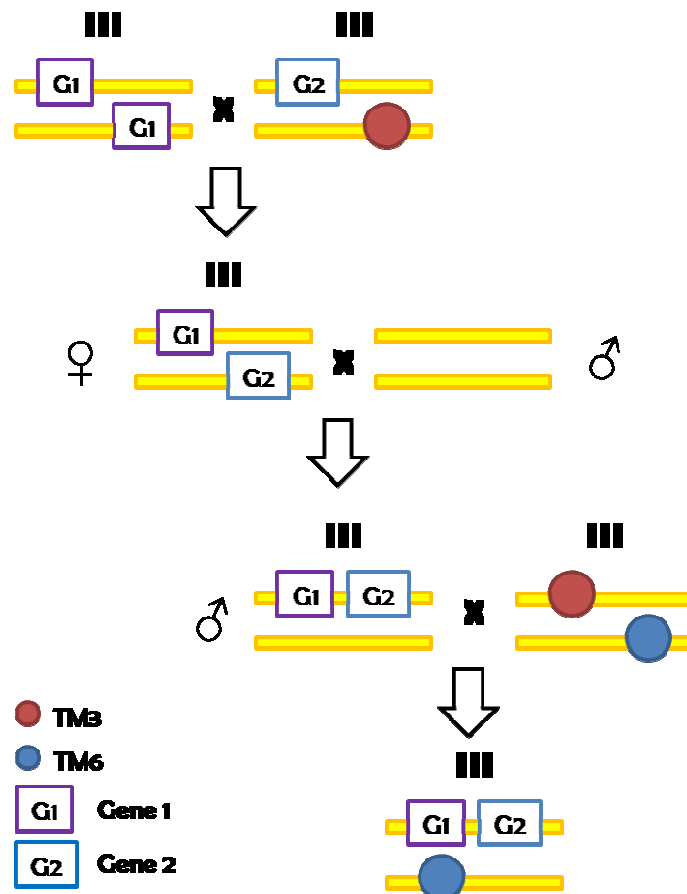


Fig. 19: Schema dell'incrocio per ottenere una linea ricombinante, avente le UAS-Marf RNAi e Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi sullo stesso cromosoma (cromosoma III) a partire dalla linea UAS-Marf RNAi omozigote (G1) e dalla linea Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi/TM3 eterozigote (G2).

1.2. Generazione della linea UAS-Opa1 RNAi / SM6; UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi/TM3

Per generare questa linea sono state incrociate due linee bilanciatrici per il II cromosoma, SM6/Tft e cyoGFP, per una linea bilanciata del III cromosoma, TM3/TM6. Nella progenie F1 sono state ottenute due linee con entrambi i cromosomi bilanciatori, che differiscono per la presenza di una GFP espressa costitutivamente ed associata al bilanciamento cyo del II cromosoma e sono stati selezionati individui con genotipo SM6/+;TM6 e cyoGFP/+;TM3/+ che sono stati incrociati rispettivamente con individui UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi/TM3 e UAS-Opa1 RNAi omozigoti. Nella progenie F2 sono stati selezionati individui che presentano il gene d'interesse ed entrambi i bilanciatori, le quali sono state incrociate tra allo scopo di generare in F3 individui UAS-Opa1 RNAi/SM6 ; UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi/TM3. Infine, per ottenere una linea stabile, individui con lo stesso genotipo sono stati incrociati tra loro.

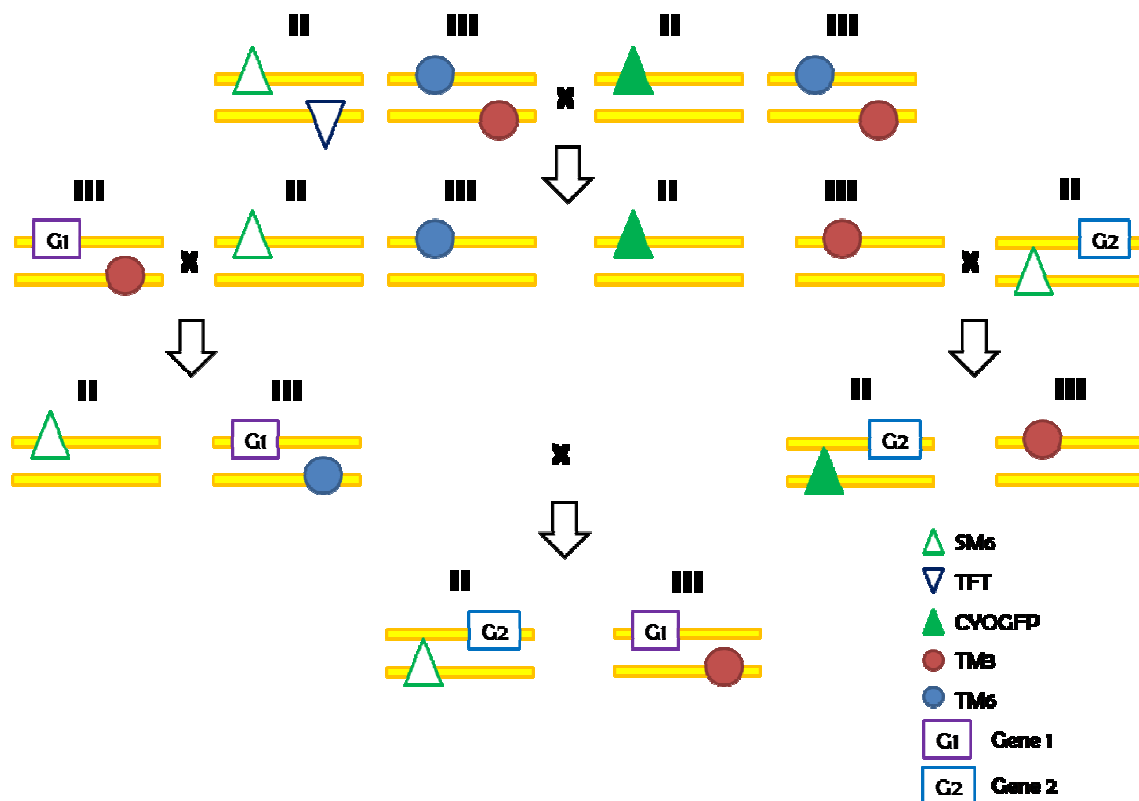


Fig. 20: Schema dell'incrocio per ottenere una linea, avente UAS-Opa1 RNAi sul secondo cromosoma e Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi sul terzo cromosoma a partire dalla linea UAS-Opa1 RNAi omozigote (G2) e dalla linea Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi/TM3 eterozigote (G1).

2. BIOLOGIA CELLULARE

2.1. Semina delle cellule

Le cellule sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza), addizionato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, fetal bovine serum) (Gibco), inattivato a 56°C per 30 minuti, e con l'aggiunta di antibiotici all'1% (penicillina e streptomina, Lonza).

Le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% di anidride carbonica e sottoposte a periodici controlli di routine per escludere contaminazioni.

La semina prevede una prima fase in cui le cellule vengono lavate con PBS 1X per due volte, staccate dal supporto di adesione con tripsina (Lonza) e precipitate a 1200 rpm per 5 minuti. Per neutralizzare l'effetto della tripsina è necessario aggiungere un egual volume di terreno prima della centrifugazione. Successivamente le cellule vengono risospese in terreno DMEM completo e contaminate con camera di Burkner. In base al tipo di esperimento che si vuole effettuare una parte delle cellule viene suddivisa in piastre o dish e le restanti trasferite in dish da 100 mm Ø per il mantenimento della linea cellulare.

- semina in piastre da 6 well o dish da 35 mm Ø (per immunocitochimica):

$0,8 \times 10^5$ - 3×10^5 cellule + DMEM completo

Totale 3 ml

- semina in dish da 60 mm Ø (per Co-immunoprecipitazione):

8×10^5 - 10×10^5 cellule + DMEM completo

Totale 5 ml

- semina in dish da 100 mm Ø (per mantenimento della linea):

1×10^6 - $1,2 \times 10^6$ cellule + DMEM completo

Totale 7 ml

Quando si intende congelare le cellule, il pellet ottenuto dopo la centrifugazione viene risospeso nella soluzione di congelamento contenente 40% DMEM, 50% FBS e 10% DMSO. Le cellule così risospese vengono trasferite in criovials e congelate lentamente passando da -80°C a -180°C in azoto liquido. Il volume di congelamento è di 1,8 - 2 ml totali.

Quando si intende scongelare, le criovials, solitamente 2, vengono messe in bagnetto termostatico a 37°C per favorire uno scongelamento rapido del campione. Successivamente, le cellule vengono trasferite in falcon da 15 ml a cui viene aggiunto

molto lentamente un volume di terreno DMEM pari al volume della soluzione di congelamento. Le sospensioni vengono centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti e risospese in un volume di DMEM completo di circa 7 ml. È necessario controllare le cellule per almeno tre giorni dopo lo scongelamento per verificare la capacità di adesione al dish, vitalità e capacità replicativa.

2.2. Tecnica di trasfezione

Il trasferimento transiente di DNA esogeno in cellule COS-7 è stato realizzato utilizzando complessi liposomici di lipidi cationici (TransIT-LT1 Reagent, Mirus). Abbiamo seminato le cellule e, trascorse 24 ore, quando le cellule raggiungono una confluenza del 60-80%, le abbiamo trasfettate.

La miscela di reazione è costituita da:

- piastre da 6 well o dish da 35 mm Ø (per immunocitochimica):

250 µl Optimem senza antibiotici

4 µl TransIT-LT1 Reagent

2 µg di DNA totale

- dish da 60 mm Ø (per Co-immunoprecipitazione):

500 µl Optimem senza antibiotici

8 µl TransIT-LT1 Reagent

2 µg di DNA totale

Incubare per 20 minuti e aggiungere la soluzione goccia a goccia alle cellule, seminate il giorno prima. È possibile trasfettare le cellule contemporaneamente alla semina. In questo caso la soluzione viene aggiunta alle cellule ancora in sospensione.

3. MICROSCOPIA

3.1. Analisi immunocitochimica (IHC)

La larva d'interesse viene posta in un apposito piattino e bloccata mediante spilli da dissezione in corrispondenza dei segmenti terminali posteriori e dell'apparato boccale. La cuticola esteriore viene tagliata longitudinalmente per tutta la lunghezza della larva e viene aggiunta una goccia di PBS 1X il tempo necessario per poter terminare la dissezione. Vengono poi fatti altri 4 tagli trasversali, due in alto e due in basso e, dopo aver rimosso gli organi interni, con altri spilli viene aperta a libro. A questo punto vengono rimosse mediante l'uso della pinzetta tutte le parti non necessarie mettendo in evidenza l'apparato muscolare e le giunzioni neuromuscolari. Si rimuove a questo

punto il PBS e si aggiunge una goccia di paraformaldeide 4% (PFA) in PBS per un tempo che può variare dai 10 minuti ai 40 minuti a seconda dell'esperimento. La larva viene quindi tolta dal piattino e vengono effettuati 3 lavaggi con Triton-X 100 0,3% in PBS 1X (PBT 0,3%) di 5 minuti ciascuno al fine di rimuovere la PFA e permeabilizzare i tessuti. Segue l'incubazione con anticorpo primario ad adeguata diluizione overnight e, il giorno dopo, ulteriori 3 lavaggi, come i precedenti. A questo punto si posiziona la larva su un vetrino portaoggetti sul quale viene posta una goccia di soluzione di montaggio Dabco e mowiol 4-88 e verrà quindi coperta con un vetrino copri oggetto e poi osservata al microscopio confocale. Per l'analisi *in vivo* le larve vengono dissezionate in soluzione fisiologica HL3 contenente glutammato 7 μ M al fine di arrestare la contrazione muscolare. A questo punto si procede direttamente all'osservazione al microscopio con apposito obiettivo ad acqua.

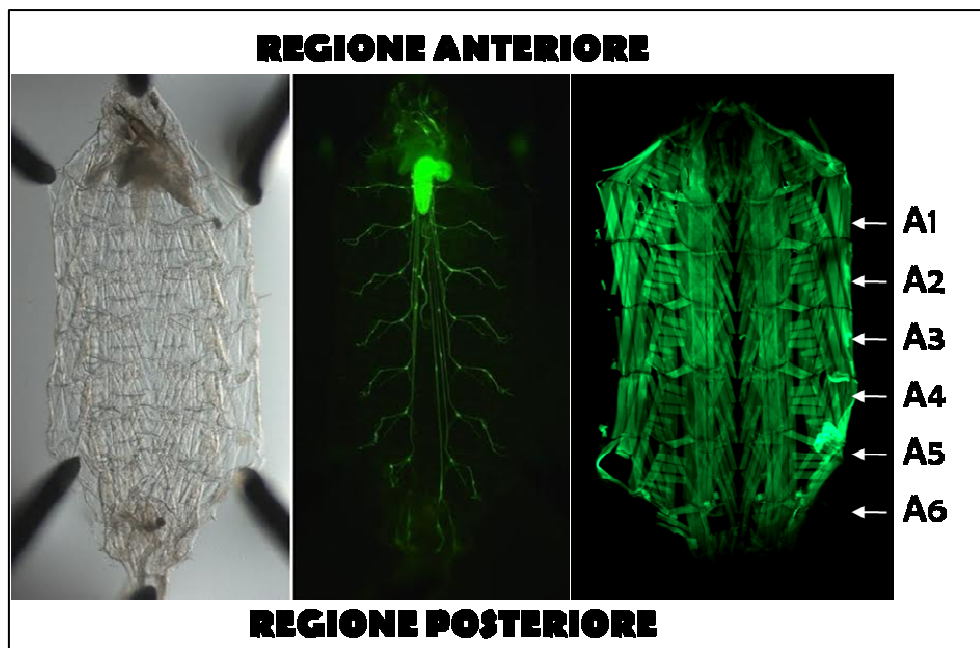


Fig. 21: Larva dissezionata. La prima immagine a sinistra mostra una larva dissezionata osservata al microscopio a luce bianca. L'immagine al centro mostra la stessa larva osservata al microscopio a fluorescenza. Sono ben visibili le membrane delle cellule neuronali marcate con anticorpo α -Horseradish Peroxidase di goat coniugato con fluoroforo Cy5 verde (α -HRP verde). È possibile distinguere il ganglio nella parte superiore, i nervi e le giunzioni neuromuscolari. L'immagine a destra mostra una larva dissezionata in cui è visibile il sistema muscolare mediante l'espressione di UAS-GFP con il driver MEF-Gal4. Con la lettera A sono indicati i diversi segmenti addominali.

3.2. Immunocitochimica (ICC)

L'immunocitochimica permette di marcare, grazie all'utilizzo di anticorpi specifici, proteine e organelli e determinarne la localizzazione intracellulare. Questa metodica prevede diversi step, che seguono la semina delle cellule su vetrini e la trasfezione:

- **fissaggio:** dopo aver aspirato il terreno e aver lavato delicatamente per 3 volte con PBS 1X, incubare le cellule con PFA 4% in PBS 1X per 10 minuti a temperatura ambiente; lavare 3 volte con PBS 1X per rimuovere residui di PFA
- **permeabilizzazione:** per favorire la penetrazione degli anticorpi, permeabilizzare le membrane con Triton-X 100 0,1% in PBS 1X (PBT 0,1%) per 10 minuti a temperatura ambiente; lavare 3 volte con PBS 1X per rimuovere il detergente.
- **saturazione dei siti aspecifici:** per impedire legami aspecifici dell'anticorpo saturare i siti aspecifici incubando con una soluzione contenente 10% FBS in PBS 1X per 10 minuti a temperatura ambiente; lavare 3 volte con PBS 1X per rimuovere residui di FBS.
- **incubazione con anticorpi:** incubare le cellule con anticorpo primario diluito in una soluzione contenente il 5% di FBS in PBS 1X per 1 ora a 37°C in ambiente umido; lavare 3 volte con PBS 1X per rimuovere residui di anticorpo. Incubare successivamente con anticorpo secondario diluito in PBS 1X per 1 ora a 37°C in ambiente umido; lavare 3 volte con PBS 1X per rimuovere residui anticorpo.
- **montaggio dei vetrini:** i vetrini vengono lavati una 1 volta in acqua deionizzata per rimuovere i sali e montati su vetrini portaoggetto utilizzando Mowiol 488 come soluzione di montaggio. Successivamente vengono analizzati al microscopio confocale.

3.3. Anticorpi

L' anticorpi utilizzati per le diverse analisi sono:

- **anticorpi primari**
 - α -Mitofusina di *Drosophila* policlonale prodotto rabbit. Diluizioni: 1:200 in PBT 0,1% per ICC, 1:100 in PBT 0,1% + 0,2% latte per WB.
 - α -GFP monoclonale di mouse prodotto da Roche. Diluizioni: 1:500 in PBT 0,1% + 0,2% latte per WB.

- α - β actina monoclonale di mouse (Sigma). Diluizioni: 1:1000 in PBT 0,1% + 0,2% latte per WB.

- **anticorpi secondari**

- α -mouse di goat coniugato con Horseradish Peroxidase (HRP) prodotto da DACO. Diluizioni: 1:10000 in PBS 1X per WB.

- α -rabbit di goat coniugato con Horseradish Peroxidase (HRP) prodotto da DACO. Diluizioni: 1:10000 in PBS 1X per WB.

- α -rabbit di goat coniugato Dylight 549 rosso prodotto da Jackson ImmunoResearch. Diluizione: 1:500 in PBS 1X per ICC.

- α -Horseradish Peroxidase di goat coniugato con fluoroforo Cy3 rosso (α -HRP rosso) prodotto da Jackson. Diluizione: 1:500 in PBT 0,3% per IHC.

3.4. Software utilizzati per l'analisi delle immagini

Le immagini sono state acquisite con microscopio confocale C1 (Nikon D-ECLIPSE C1) e sono state analizzate con i software Nikon EZ-C1 (versione 3.91), Volocity (PaerkinElmer Company, Santa Clara, CA) e ImageJ (versione 1.41o).

3.5. Obiettivi per microscopio confocale

Obiettivo ad olio:

Nikon PLAN Apo, 60XA/1.40 oil DIC H, ∞ /0.17 WD 0.21

Obiettivo ad acqua:

Nikon FLUOR, 60X/1.00W DIC H/N2, ∞ /0 WD 2.0

3.6. Analisi del trasporto mitocondriale lungo gli assoni di *Drosophila* con la tecnica del photobleaching

L'analisi *in vivo* del trasporto mitocondriale è stata effettuata utilizzando una linea UAS-mitoGFP/SM6 ; ELAV-Gal4/TM6 in cui i mitocondri sono visibili per la presenza di una GFP mitocondriale espressa nei neuroni presinaptici di *Drosophila* mediante il driver ELAV-Gal4 e ciò permette studi di live imaging.

Individui della linea UAS-mitoGFP/SM6 ; ELAV-Gal4/TM6 sono stati incrociati con le seguenti linee :

- W¹¹¹⁸
- UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵RNAi/TM6
- UAS-Marf RNAi

- UAS-Opa1 RNAi
- UAS-Marf RNAi, UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵RNAi/TM6
- UAS-Opa1 RNAi; UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵RNAi

L'incrocio viene mantenuto a temperatura costante (28°C).

Una volta incrociata ciascuna linea per il driver , abbiamo selezionato le larve di interesse al microscopio a fluorescenza (LEICA MZ 16 FA) e le abbiamo dissezionate secondo il protocollo utilizzato per il live imaging.

La tecnica del photobleaching prevede quattro fasi:

- Selezione dell'area su cui effettuare il photobleaching (40 µm)
- Preview: il laser passa sul campione alla potenza impostata (30%) con lo scopo di visualizzare l'immagine e poter sistemare il fuoco (1 volta)
- Bleaching: tutti i laser alla massima potenza (100%) passano sul campione al fine di eliminare la fluorescenza dalla zona considerata (30 volte)
- Recovery: il laser passa sul campione ogni 4 secondi per un tempo totale di 200 secondi e il software memorizza le singole immagini ottenute (50 volte)

Le immagini sono state analizzate con Volocity.

3.7. Preparazione di cervelli di larva per microscopia elettronica

Gli studi di microscopia elettronica necessitano di larve al terzo stadio, dalle quali vengono isolati i cervelli. La larva deve essere tenuta mediante pinzette ad entrambe le estremità, e tirandola dalla parte anteriore. Il cervello così isolato viene incubato in 100 µl di soluzione di fissaggio contenente PFA 8%, glutaraldeide 2,5% e Hepes 0,3 M per un'ora e poi conservato fino ad osservazione al microscopio elettronico in 300 µl della soluzione di fissaggio e 300 µl di Hepes 0,15 M. Le analisi di microscopia elettronica sono state effettuate dall' unità di microscopia elettronica del Dipartimento di Biologia dell' Università di Padova.

4. TECNICHE BIOCHIMICHE E BIOMOLECOLARI

4.1. Co-immunoprecipitazione

La tecnica di co-immunoprecipitazione (Co-IP) è una metodica ampiamente utilizzata per analizzare le interazioni proteina-proteina. Questa tecnica si basa sull'evidenza infatti che la maggior parte delle interazioni proteiche che avvengono *in vivo* sono

mantenute quando la cellula *in vitro* è sottoposta a lisi in condizioni non denaturanti. Noi abbiamo utilizzato una resina costituita da biglie metalliche fuse alla proteina A (Dynabeads Protein A, Life Technologies), in grado di riconoscere e legare la catena pesante di qualsiasi anticorpo. In questo modo è possibile utilizzarla per esperimenti diversi cambiando di volta in volta l'anticorpo.

Lo scopo della nostra analisi è quello di verificare l'interazione tra le proteine Marf e Miro di *Drosophila*. Abbiamo seminato e trasfettato le cellule con due diversi costrutti:

- 1 µg di Marf-V5 in pcDNA₃
- 1 µg di Miro-GFP in pcDNA₃

Per verificare che la trasfezione sia avvenuta, abbiamo trasfettato delle cellule con gli stessi costrutti su cui effettuare una ICC.

Trascorse 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state tripsinizzate dal dish con 1 ml di tripsina per 5 minuti a 37°C, raccolte in un'ependorf da 1,5 ml e lisate per 10 minuti in ghiaccio con buffer non denaturante contenente 100 µl PBT 0,2 % e 10% inibitori di proteasi (Roche). I lisati sono stati centrifugati a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C per precipitare nuclei, membrane e porzioni di organelli non lisati. Le proteine in soluzione (LYS) sono state quantificate allo spettrofotometro e incubate per 10-20 minuti in agitazione a temperatura con 200 µl di sospensione di biglie magnetiche precedentemente preparate. Le biglie prima dell'utilizzo devono essere risospese in un apposito buffer contenente l'anticorpo d'interesse (50 µl di sospensione di biglie, 200 µl di Binding and Washing Buffer + 1-10 µg di anticorpo α-GFP). Eliminare il surnatante (SN) (proteine non legate alla resina), lavare la resina 3 volte con 200 µl di Washing Buffer e eluire (E) in 100 µl di Sample Buffer, Leammli 1X (stock LB 2X, Sigma). Le diverse frazioni raccolte (LYS, SN, E) e analizzate mediante SDS-PAGE e Western Blot.

4.2. SDS-PAGE

L'elettroforesi in SDS-PAGE permette la separazione di componenti proteici e si basa essenzialmente sulle dimensioni delle catene peptidiche. Ciò è possibile grazie all'utilizzo del detergente anionico, sodio dodecilsolfato, che si lega fortemente alle proteine in rapporto di circa una molecola di SDS ogni due residui di aminoacidi. Questa interazione non solo provoca la destabilizzazione della struttura terziaria della proteina denaturandola (linearizzazione), ma le conferisce pure una carica netta negativa approssimativamente proporzionale alla sua massa, in modo che il rapporto carica/massa sarà essenzialmente identico per proteine diverse (la carica netta della proteina nativa è trascurabile).

La separazione dei complessi SDS-proteine avviene in base agli effetti di setaccio molecolare dovuti alle dimensioni dei pori del gel di acrilammide. Ciò fa sì che le proteine più piccole si muovano rapidamente attraverso il gel, mentre quelle di dimensioni maggiori, rallentate, migrano meno.

Il gel è costituito da acrilamide in percentuale variabile in base alla risoluzione di separazione dei frammenti. Si ottiene dalla copolimerizzazione di molecole di acrilamide le quali danno origine a legami trasversali così da formare un reticolo tridimensionale. La polimerizzazione viene innescata da una reazione a catena che porta alla formazione di radicali liberi in seguito all'aggiunta di ammonio persolfato che attivano *N,N,N',N'*-tetraetilendiammina (TEMED, sigma). Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione del corrispondente radicale libero (ovvero una molecola con un elettrone spaiato).

Si utilizza un gel discontinuo composto da stacking gel nel quale vengono formati i pozzetti in cui vengono depositati i campioni da analizzare, e da running gel (gel di risoluzione), matrice in grado di separare le singole macromolecole.

Lo stacking gel ha anche la funzione di impaccare, comprimere e quindi concentrare i componenti proteici.

Una volta determinata la concentrazione proteica del campione, si caricano nel gel 40µg di proteine totali per pozzetto. Se utilizziamo i minigel, i pozzetti possono contenere fino a 25µl di campione. Ai campioni poi viene aggiunta LB 2X in quantità pari a metà del volume totale. Questa contiene TRIS-Cl pH 6.8, SDS, β-mercaptoetanololo (agente riducente), glicerolo (addensante) e blu di bromofenolo, tracciante colorato che permette di seguire l'andamento della corsa elettroforetica.

I campioni vengono bolliti a 100°C per 5 per favorire la completa denaturazione delle proteine e successivamente caricati. La corsa viene effettuata a 200 V.

Per identificare il peso delle proteine viene caricato anche un marker di pesi molecolari (PageRuler Prestained Protein Ladder, ThermoScientific)

4.3. Western Blot (WB)

La tecnica del western blotting permette di identificare specifiche proteine con l'uso di anticorpi in grado di riconoscerle.

Una volta terminata la corsa elettroforetica le proteine vengono trasferite su nitrocellulosa. Per far questo è necessario idratare il gel per qualche minuto nel tampone di trasferimento conservato a 4°C. Si crea poi un sandwich costituito da

spugna, carta assorbente imbevuta di tampone, membrana di nitrocellulosa, gel e di nuovo carta assorbente e spugna. Il tutto viene posto nell'apparato per il trasferimento in modo tale che la nitrocellulosa sia rivolta verso il polo positivo così che le proteine nel gel, cariche negativamente, migrino verso il polo positivo incontrando e legandosi alla membrana. Il tempo di trasferimento è di circa 1 ora e mezza a 200mA a 4°C.

Terminato il trasferimento, la nitrocellulosa viene colorata con rosso ponceau 0,2% p/v in acido tricloroacetico 3% p/v, un colorante reversibile delle proteine che permette di verificare l'avvenuto trasferimento e da un indice della correttezza del caricamento.

4.3.1. Rilevazione delle proteine

La membrana di nitrocellulosa viene posta per circa 10 minuti a saturare in una soluzione di TBS-T Buffer 1X + 10% latte in polvere: in questo modo le proteine del latte si legano ai siti aspecifici della membrana. Vengono poi aggiunti gli anticorpi primari α -Marf rabbit, α -GFP mouse e α - β actina mouse, diluiti in TBS-T 1X + 0,2% latte in polvere. Il filtro viene quindi incubato over night a 4°C sotto lenta agitazione.

Si effettuano quindi 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con TBS-T 1X per rimuovere l'eccesso di anticorpi primari non legati e si procede con l'aggiunta degli anticorpi secondari (α -mouse e α -rabbit coniugati con HRP). Si effettuano infine 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno con TBST 1X per rimuovere l'eccesso di anticorpi secondari non legati e si procede allo sviluppo con ECL.

Si utilizza GE Healthcare ECL kit, sistema chemiluminescente che sfrutta un metodo per rilevare antigeni immobilizzato su membrana di nitrocellulosa. La membrana viene trattata per 1 minuto con una miscela contenente, in rapporto 1:1, una soluzione contenente H₂O₂ e il substrato (luminol). La perossidasi reagisce con H₂O₂ in soluzione e, legandosi al substrato chemiluminescente, innesca una reazione di chemiluminescenza visualizzabile su lastre autoradiografiche dopo aver lasciato in esposizione per un tempo variabile, determinato dal tipo di anticorpo usato.

Le bande vengono visualizzate sulla lastra immergendola per qualche secondo in una soluzione di sviluppo e fissate trasferendola in una soluzione di fissativa. Infine le lastre vengono lavate in acqua e analizzate.

4.4. Respirazione mitocondriale

Per misurare la capacità delle larve di consumare ossigeno, abbiamo utilizzato l'elettrodo di Clark (Hansatech) che permette di misurare la quantità di ossigeno

all'interno di una cameretta chiusa e collegata all'esterno mediante un tappo forato. Dopo avere identificato con varie prove il peso di larve necessario per riuscire a discriminare eventuali differenze, abbiamo effettuato le misurazioni. Abbiamo omogenizzato le larve nel buffer di respirazione e abbiamo valutato la capacità di consumo di ossigeno (nmoli/min) in condizioni basali per circa 3 minuti e dopo l'aggiunta di rotenone 5 μ M in cloroformio (Sigma) e Antimicina A 5 μ M in etanolo 96% (Sigma) per altri 3 minuti. L'aggiunta di R + AA blocca la catena respiratoria a livello del complesso I e III, permettendo di discriminare la respirazione mitocondriale da quella extramitocondriale. Abbiamo calcolato la quantità di ossigeno consumato dai mitocondri e sottratta quantità extramitocondriale. Infine abbiamo normalizzato i dati ottenuti per il peso in mg delle larve intere.

4.5. Dosaggi enzimatici

Le attività enzimatiche dei complessi respiratori mitocondriali sono state misurate preparando mitocondri "crudi" da larve di *Drosophila* al terzo stadio di sviluppo per ciascun genotipo analizzato. Attraverso alcuni esperimenti preliminari, è stata stimata la quantità di larve necessaria per avere materiale sufficiente a svolgere gli esperimenti. Considerando che la grandezza delle larve varia a seconda del genotipo sono state utilizzate le seguenti quantità:

- W¹¹¹⁸ : 60 larve
- UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵RNAi/TM6 : 60 larve
- UAS-Marf RNAi : 250 larve
- UAS-Opa1 RNAi : 250 larve
- UAS-Marf RNAi, UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵RNAi/TM6 : 90 larve
- UAS-Opa1 RNAi; UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵RNAi : 250 larve

Le larve raccolte sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80°C.

Al momento dell'utilizzo le larve sono state risospese in 3 ml di buffer per l'isolamento dei mitocondri al quale sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi e la sospensione è stata omogenata con un potter di vetro e pestello di teflon utilizzando un omogenizzatore elettrico (15-20 volte a velocità 6 in ghiaccio). L'omogenato è stato successivamente centrifugato in centrifuga da tavolo Eppendorf a 2000 rpm per 10 minuti a 4° al fine di precipitare porzioni di cuticola e cellule intere. Il sovrantante ottenuto è stato centrifugato nuovamente a 13000 rpm per 20 minuti a 4°C per

precipitare i mitocondri “crudi”. Il pellet è stato risospeso in 200 μ l dello stesso buffer utilizzato per l'isolamento dei mitocondri. I mitocondri sono stati utilizzati immediatamente per il dosaggio.

4.5.1. Attività del complesso I (CI)

L'attività del complesso I è stata valutata misurando la capacità dell'enzima di ridurre il chinone ossidato (decilbenzochinone, DB) in chinone ridotto (DBH_2). DB è un analogo del Coenzima Q_{10} (CoQ_{10}). La reazione è stata seguita allo spettrofotometro grazie all'aggiunta di 2,6-Dichloro-4-[(4-hydroxyphenyl)imino]-2,5-cyclohexadien-1-one (DCIP), colorante che accetta elettroni dal chinolo formatosi nella reazione con conseguente viraggio del colore della soluzione da blu a trasparente. La lettura è stata fatta allo spettrofotometro Jasco V550 alla lunghezza d'onda 600 nm, in cella termostata a 25°C e sotto continua agitazione. L'attività enzimatica è stata calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare del DCIP (ϵ) pari a $19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e normalizzandola per il contenuto proteico.

La mix di reazione è così composta:

- 1 ml di buffer 50mM KH_2PO_4 , EDTA 1mM, 2mM KCN pH 7.6
- 60 μ M DCIP
- 50 μ M DB
- 1 μ M antimicina A (inibitore di CIII)
- 10 μ l di mitocondri isolati

La reazione è stata fatta partire aggiungendo 150 μ M NADH

4.5.2. Attività del complesso III (CIII)

L'attività del complesso III è stata valutata misurando la capacità dell'enzima di ridurre il Citocromo C ossidato (Cyt C^{3+}) in Citocromo C ridotto (Cyt C^{2+}) in presenza di DB ridotto (DBH_2). La reazione è stata seguita allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda 550 nm, in cella termostata a 25°C e sotto continua agitazione. L'attività enzimatica è stata calcolata utilizzando $\epsilon=19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e normalizzandola per il contenuto proteico.

La mix di reazione è composta da:

- 1 ml di buffer 50mM KH_2PO_4 , EDTA 1mM, 2mM KCN pH 7.6
- 20 μ M CytC^{3+}
- 1 μ M rotenone (inibitore di CI)
- 10 μ l di mitocondri isolati

La reazione è stata innescata aggiungendo 50 μM DBH_2

4.5.3. Attività del complesso IV

L'attività del complesso IV è stata valutata misurando la capacità dell'enzima di ossidare il Citocromo C ridotto (Cyt C^{2+}) in Citocromo C ossidato (Cyt C^{3+}). La reazione è stata seguita allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda 550 nm, in cella termostata a 25°C e sotto continua agitazione. L'attività enzimatica è stata calcolata utilizzando $\epsilon=19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e normalizzandola per il contenuto proteico.

La mix di reazione è costituita da:

1 ml di buffer 50mM KH_2PO_4 , EDTA 1mM pH 7.6
20 μM CytC^{2+}

La reazione inizia aggiungendo 10 μl di mitocondri isolati.

4.5.4. Attività della citrato sintasi

L'attività dell'enzima citrato sintasi è stata misurata per normalizzare i dati ottenuti, sia quelli riguardanti le attività dei complessi enzimatici prima descritti sia quelli ottenuti dalla sintesi di ATP, descritta in seguito. L'attività della citrato sintasi, infatti, è generalmente riconosciuta come un indicatore della massa mitocondriale del campione.

Il dosaggio è stato effettuato allo spettrofotometro in cella termostata a 25°C e sotto continua agitazione utilizzando il reagente di Ellman (acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzico, DTNB). La reazione che si ottiene è di tipo colorimetrico e l'assorbimento viene letto alla lunghezza d'onda di 412 nm in cui il substrato ridotto ha massimo picco di assorbimento. La concentrazione viene calcolata considerando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon=13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A temperatura ambiente DTNB si presenta come un solido inodore di color bruno. È spesso usato per l'analisi qualitativa e quantitativa dei tioli che, reagendo con il composto, portano alla rottura del ponte disolfuro producendo lo ione NTB^- che in acqua, a pH neutro o alcalino, si ionizza dando origine allo ione NTB^{2-} di colore giallo.

La miscela di reazione è composta da:

0,85 ml di TRIS 125 mM pH 8 + 0,1 % Triton-X 100
0,3 mM di AcetilCoA (substrato dell'enzima)
0,1 mM di DTNB
10 μl di mitocondri isolati

Dopo 1 minuto in agitazione, la reazione viene innescata aggiungendo come substrato dell'enzima 0,5mM di ossalacetato sciolto in acqua e preparato fresco.

4.6. Sintesi di ATP

Come per i dosaggi delle attività enzimatiche sono state selezionate larve di *Drosophila* al terzo stadio del genotipo da analizzare. Il numero delle larve utilizzate e la preparazione dei mitocondri è lo stesso dei dosaggi enzimatici. In questo caso le larve sono state utilizzate fresche e non congelate.

La reazione di sintesi di ATP è stata misurata al luminometro di Berthold e procedendo come descritto:

- sintesi di ATP indotta da substrati che producono NADH per il complesso I
 - 140 μ l di buffer 150mM KCl, 25mM Tris, 2mM EDTA, 10mM KPi, 0.1mM MgCl₂, 0.1% BSA pH 7.4
 - 10 μ l di mitocondri isolati
 - 6,4 μ l di piruvato 25 mM (substrato esterno)
 - 6,4 μ l di malato 25 mM (substrato esterno)
 - 10 μ l mix luciferina/luciferasi kit

-sintesi di ATP da complesso II

- 140 μ l di buffer 150mM KCl, 25mM Tris, 2mM EDTA, 10mM KPi, 0.1mM MgCl₂, 0.1% BSA pH 7.4
- 10 μ l di mitocondri isolati
- 6,4 μ l di succinato 125 mM (substrato esterno)
- 1 μ l di rotenone 0,9 mM (per bloccare il complesso I)
- 10 μ l mix luciferina/luciferasi kit

La reazione viene fatta partire aggiungendo 6,4 μ l di ADP 2,5 mM.

Quando la traccia è lineare si aggiunge 1 μ l di Oligomicina 1 mM per bloccare l'ATP sintasi e 2 μ l di ATP 1 mM come standard interno.

Le attività enzimatiche sono state normalizzate sull'attività della citrato sintasi dello stesso campione .

4.7. Real Time PCR quantitativa (qRT-PCR)

La tecnica di qRT-PCR è una metodica altamente sensibile che permette di determinare in modo quantitativo i livelli di mRNA in un campione e viene spesso

utilizzata per testare l'espressione genica. La quantità di mRNA presente nel campione viene determinata utilizzando One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit II (Takara), che permette in un unico step di ottenere i risultati. La tecnica prevede una fase iniziale di retrotrascrizione dell'RNA totale in cDNA e una seconda fase in cui esso viene amplificato. È necessario utilizzare primer altamente specifici per il gene d'interesse disegnati a cavallo di due introni in modo da impedire la retrotrascrizione di DNA genomico, contaminante del campione. Si ottiene un amplicone di circa 100 bp.

L'RNA totale è stato estratto la larve con Trizol (Invitrogen).

I dati sono stati normalizzati su un gene sempre espresso RP49.

Di seguito l'elenco dei primer forward (For) e reverse (Rev) utilizzati:

NOME PRIMER	SEQUENZA PRIMER
RP49 For	5'-AGGCCCAAGATCGTGAAGAA-3'
RP49 Rev	5'-TCGATACCCTTGGGCTTGC-3'
DRP1 For	5'-TCCACAATCTTCTCGTGCAG-3'
DRP1 Rev	5'-CATTACGAGGAGATGCAGC-3'
MARF For	5'-GTATGTCCATGAGACGACCA-3'
MARF Rev	5'-CTTGTACACATAGCTTTTCCA-3'
OPA1 For	5'-GACTCTGACCGGAATACGA-3'
OPA1 Rev	5'-CTAGAACCATGCGTTGCAGA-3'

Tab. 1: Tabella delle sequenze 5'-3' dei primer Forward e Reverse utilizzate negli esperimenti di qRT-PCR

Ogni reazione è stata preparata in un volume totale 10 µl ed è composta da:

5 µl 2x One Step SYBR RT-PCR Buffer

0,2 µl Primer Forward

0,2 µl Primer Reverse

0,1 µl 50x Rox Reference Dye

0,4 µl Primer Script Step Enzime Mix

3 µl RNA (0,1 µg)

1,1 µl H₂O RNAsi Free

10 µl Totali di reazione

La reazione prevede 3 fasi:

Step di reazione	Temperatura	Tempo
Retrotrascrizione	50°	15 minuti
	95°	2 minuti
Amplificazione	95°	15 secondi
	60°	1 minuto
Curva di melting	95°	15 secondi
	55°	15 secondi
	95°	15 secondi

Tab.2: La tabella riassume le varie fasi di reazione della qRT-PCR e riporta per ogni fase temperatura, tempo e eventuali ripetizioni.

4.6.1. Estrazione dell'RNA totale da larva

Raccogliere le larve d'interesse in una eppendorf (da 10 a 25 larve), aggiungere 100 µl di TRIZOL e omogeneizzare con potter. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugare a 12000 g per 10 minuti a 4°C al fine di precipitare residui di cuticola e lipidi presenti nella sospensione. Trasferire il surnatante in una nuova eppendorf, aggiungere 20 µl di cloroformio per estrarre gli acidi nucleici, agitare per 15 secondi e incubare per 2-3 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare a 12000 g per 10 minuti a 4°C. Si separano così tre fasi: sul fondo una fase rossa costituita da fenolo e cloroformio, in sospensione una fase acquosa contenente RNA totale e tra le due, una fase intermedia biancastra contenente detriti cellulari e lipidi. Recuperare la soluzione acquosa, aggiungere 100 µl di etanolo 70% in H₂O RNAsi free per precipitare l'RNA e centrifugare a 7500 g per 5 minuti a 4°C. Infine, risospingere il pellet con 30-50 µl H₂O RNAsi e incubare per 10 minuti a 60°C. L'RNA così ottenuto è stato quantificato allo spettrofotometro (NanoDrop 2000C, ThermoScientific).

MATERIALI

1. Soluzioni utilizzate

Medium nutritivo per *D. melanogaster*

9 g Agar-Agar

35 g Lievito

35 g Glucosio

2 g Nipagina sciolta in 10 ml di Etanolo 96%

Aggiungere 800 ml di acqua

Portare ad ebollizione (20 minuti a 100°C in autoclave)

PBS 10x (1L)

80 g NaCl

2 g KCl

2,4 g Na₂HPO₄

Portare a pH 7,4

Portare al volume con H₂O distillata.

Paraformaldeide 4% (PFA 4%)

10 ml PFA 8%

4 ml PBS 5x

6 ml H₂O

Mowiol 40-88 (Sigma-Aldrich)

2,4 g Mowiol

6 g Glicerolo

Agitare per 10 minuti.

Aggiungere 6 ml di H₂O distillata.

Agitare per ulteriori 4 ore alla temperatura di 50°C.

Aggiungere:

12 ml TRIS-Cl 100 mM pH 8.5

0.1 % DABCO

Centrifugare a 6000 rpm per 15 minuti

Conservare aliquote a -20°C.

HL3

70 mM NaCl

5 mM KCl

1,5 mM CaCl₂

20 mM MgCl₂

10 mM NaHCO₃

5 mM Trealosio

115 mM Saccarosio

5 mM HEPES

Portare a pH 7.3

Running Buffer 5X (1L)

25 mM TRIS

250 mM Glicina

0,1 %SDS

Portare a volume con H₂O deionizzata

Transfer Buffer 10X (1L)

25 mM TRIS

192 mM Glicina

Portare a volume con H₂O deionizzata

Staking Gel (2 gel)

2,9 ml H₂O

0,5 ml Acrilammide 40%

0,5 ml TRIS-Cl pH 6,8

20 µl SDS 20%

40 µl APS 10%

5 µl TEMED

Runnig Gel 10% (1 gel)

21,7 ml H₂O

1,25 ml Acrilammide 40%

1,95 ml TRIS-Cl pH 8,8

25 µl SDS 20%

50 µl APS 10%

5 µl TEMED

APS 10%

1 g APS

10 ml H₂O

TBS-T Buffer 10X (1L)

100 mM TRIS

1,5 M NaCl

1 % Tween-20

Portare a volume con H₂O deionizzata

Buffer di respirazione

120 mM saccarosio

50 mM KCl

20 mM TRIS-Cl pH 7,4

4 mM KH₂PO₄

4 mM MgCl₂

1 mM EGTA pH 8

0,01% digitonina (Sigma)

Buffer per l'isolamento dei mitocondri interi per sintesi ATP

70 mM saccarosio

200 mM mannitolo

10 mM KH₂PO₄

2 mM Hepes

1 mM EGTA

4 mg/ml BSA

Portare a pH 7,2

Buffer per la sintesi di ATP

150 mM KCl

25 mM TRIS
2 mM EDTA
10 mM KP_i
0,1 mM $MgCl_2$
0,1 %BSA
Portare a pH 7,4

Buffer per microscopia elettronica

Buffer fissativo

200 μ l PFA 8%
8 μ l glutaraldeide 25%
200 μ l Hepes 0,3 M

Buffer di conservazione

300 μ l Buffer fissativo
300 μ l Hepes 0,15 M

2. Linee cellulari

La linea cellulare COS-7, utilizzata per gli studi di ICC, è una linea derivata da tessuto renale di scimmia. Le cellule COS si comportano come fibroblasti e in origine sono state ottenute in laboratorio nel 1960 in seguito ad immortalizzazione di cellule renali di scimmia africana con il virus SV40, che porta alla produzione di un'elevata quantità di antigeni T ma non replica in modo corretto. Esistono diversi tipi di cellule COS, tra cui le cellule COS-1 e le cellule COS-7, ampiamente utilizzate in laboratorio per lo studio di proteine ricombinanti, anticorpi e molecole implicate nella trasduzione del segnale. La linea COS-7 è stata sviluppata nel 1980 trasformando le cellule COS con una sequenza di SV40 che codifica per l'antigene-T wilde type.

3. Linee di *Drosophila*

Le linee di *Drosophila* utilizzate in questo lavoro sono:

W^{1118} , Cyo/Tft, Cyo,Act-GFP, TM3/TM6, GMR-Gal4 (II), ELAV-Gal4(III), TUB-Gal4(III), UAS-mitoGFP (Bloomington *Drosophila* Stock Centre), UAS-Drp1⁴⁴¹⁵⁵ RNAi(III), UAS-Marf RNAi (III) e UAS-Opa1 RNAi(II) (VDRC, Vienna *Drosophila* RNAi Collection).

RISULTATI

1. Analisi della morfologia mitocondriale nel corpo cellulare di neuroni e negli assoni di *Drosophila*

Numerose patologie neurodegenerative sono associate ad alterazioni della morfologia mitocondriale dovute a mutazioni nei geni che codificano per proteine coinvolte nei meccanismi di fusione e fissione delle membrane mitocondriali. Abbiamo analizzato con microscopia confocale corpi cellulari e assoni di *Drosophila* per capire se la riduzione dell'espressione di proteine che hanno un ruolo principale nei processi di dinamica mitocondriale potesse alterare la morfologia, il network e la distribuzione mitocondriale.

Per ridurre il livello d'espressione di questi geni in *Drosophila* sono state utilizzate linee UAS-RNAi, RNAi, UAS-Drp1 RNAi, UAS-Marf RNAi e UAS-Opa1 RNAi che esprimono ciascuna un transgene per RNA interference in vivo con conseguente riduzione dell'espressione endogena dell' mRNA del gene target. Per verificarne l'efficienza, in ogni linea UAS-RNAi è stata espressa in modo ubiquitario usando il driver TUB-Gal4/TM6 ed è stata esaminata con Real Time PCR quantitativa (qRT-PCR) per verificare se i livelli trascrizionali dell'mRNA del gene considerato fossero ridotti comparandoli con il controllo wild-type W^{1118} . Poiché l'attività di Gal4 è temperatura-dipendente, per massimizzare l'effetto in vivo dell'RNAi trasgenico, l'incrocio è stato mantenuto a 28°C. Abbiamo selezionato le larve UAS-RNAi/TUB-Gal4, isolato l'RNA e messo a punto l'esperimento di qRT-PCR. I livelli di mRNA del gene analizzato sono stati normalizzati su i livelli di mRNA del gene housekeeping RP49. Dall'analisi dei dati di qRT-PCR risulta che l'espressione di UAS-Drp1 RNAi è ridotta del 60%, quella di UAS-Marf RNAi abbassa di circa 80% il livello endogeno di espressione di mRNA di Marf ed infine l'espressione di UAS-Opa1 RNAi riduce di circa il 60% la quantità di mRNA di Opa1 (Fig.22).

Sono state analizzate inoltre due linee generate in laboratorio, mediante una serie di incroci genetici, in cui sono espressi contemporaneamente due RNAi che abbattano l'espressione di proteine con funzione opposta nella dinamica mitocondriale: UAS-Marf RNAi UAS-Drp1 RNAi e UAS-Opa1 RNAi UAS-Drp1 RNAi. Queste linee sono state incrociate con il driver TUB-Gal4 per ottenere gli individui sperimentali. E' stato quindi necessario verificare che la presenza di due transgeni non modificasse l'efficacia dei singoli RNAi. I risultati ottenuti dall'analisi di qRT-PCR mostrano che la riduzione dei livelli di ciascun mRNA nelle linee che esprimono simultaneamente due costrutti per

RNAi è paragonabile alla riduzione ottenuta singolarmente con ciascun costrutto RNAi (Fig. 22).

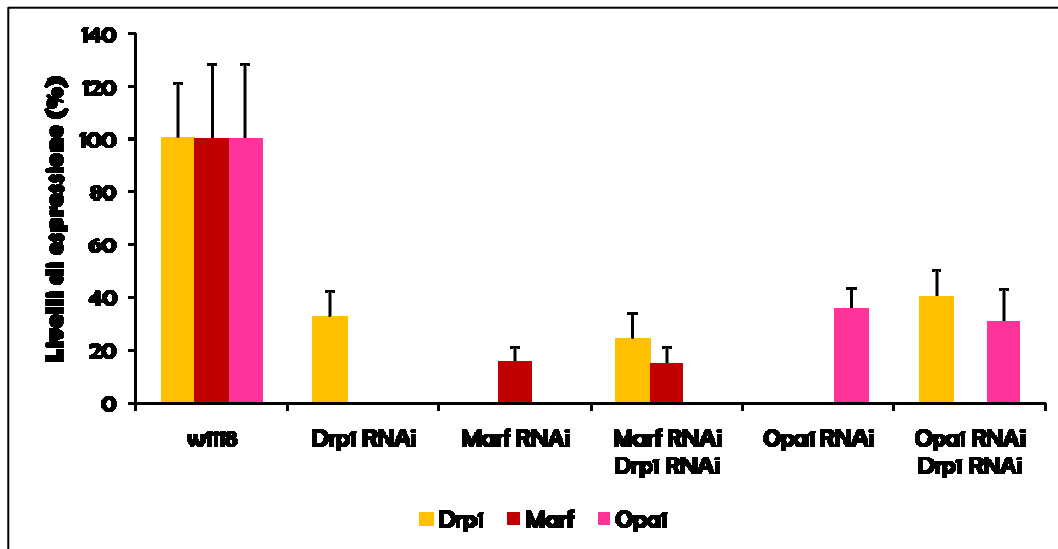


Fig. 22: Grafico dei livelli di espressione delle linee UAS-RNAi. Il grafico mostra i risultati di qRT-PCR: si osserva una riduzione dei livelli di mRNA endogeno di Drp1, Marf e Opat rispettivamente nelle linee UAS-Drp1 RNAi, UAS-Marf RNAi e UAS-Opat RNAi rispetto ai controllo W^{1118} . I dati sono stati normalizzati sui livelli di espressione del gene RP49.

Anche le linee che esprimono contemporaneamente due costrutti per RNAi, UAS-Marf RNAi UAS-Drp1 RNAi e UAS-Opat RNAi UAS-Drp1 RNAi, mostrano una riduzione dell'espressione dei geni Drp1, Marf e Opat paragonabile con quella del singolo costrutto.

Poiché tuttavia l'espressione ubiquitaria di Marf RNAi e Opat RNAi risulta letale ad uno stadio di sviluppo precoce, gli RNAi per questi geni sono stati espressi in modo specifico nel sistema nervoso utilizzando il promotore ELAV-Gal4. Sebbene letale, l'espressione neuronale consente agli individui di raggiungere uno stadio di sviluppo che permette l'analisi agevole del network mitocondriale.

Allo scopo di visualizzare la morfologia mitocondriale, le linee UAS-RNAi sono state incrociate con la linea UAS-mitoGFP/SM6; ELAV-Gal4/TM6 che contiene il promotore ELAV per l'espressione tessuto-specifica nei neuroni ed esprime una GFP mitocondriale, controllata dallo stesso promotore ELAV, per visualizzare il network mitocondriale. Sfruttando la fluorescenza della GFP, nella progenie sono state selezionate larve al terzo stadio di genotipo UAS-mitoGFP/+;ELAV-Gal4/+ come controllo e larve

sperimentali che esprimono anche il costrutto UAS-RNAi nelle quali è analizzata, sia nel corpo cellulare sia negli assoni, la morfologia dei mitocondri.

A differenza del controllo (Fig. 23A), dove i mitocondri creano un network altamente interconnesso nel corpo cellulare dei neuroni, in individui UAS-Marf RNAi ; UAS-mitoGFP/+;ELAV-Gal4/+ abbiamo osservato agglomerati di mitocondri nel soma e la perdita totale del network mitocondriale (Fig 23C). Lungo gli assoni è evidente che la riduzione di espressione di Marf causa frammentazione mitocondriale (Fig. 24C). Un fenotipo analogo è causato anche dall'espressione della linea UAS-Opa1 RNAi, in cui i mitocondri risultano altamente frammentati lungo l'assone (Fig. 24D) e a livello del corpo cellulare si osservano aggregati mitocondriali che appaiono però di dimensioni più piccole rispetto alla linea UAS-Marf RNAi (Fig. 23D). Nel caso invece della linea UAS-Drp1 RNAi, come ci si attende dalla perdita di funzione della proteina responsabile del processo di fissione mitocondriale, i mitocondri lungo l'assone risultano allungati rispetto al controllo (Fig. 24B). Tuttavia, nel corpo cellulare la morfologia generale del network mitocondriale è abbastanza conservata. Il fenotipo lieve è comprensibile perché la linea UAS-Drp1 RNAi non è molto efficace nell'abbattere il livello di espressione della proteina (Fig. 23B).

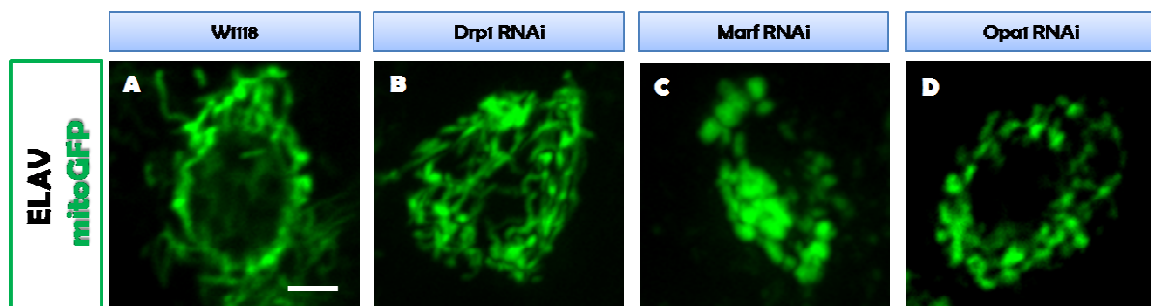


Fig. 23: Immagine di microscopia confocale di corpi cellulari di neuroni. I mitocondri sono marcati grazie all'espressione nel sistema nervoso di una GFP mitocondriale. Le immagini mostrano che il network mitocondriale in corpi cellulari di controllo è altamente interconnesso (A). Nella linea in cui è ridotta l'espressione di Drp1 il network è paragonabile al controllo (B). Nei corpi cellulari in cui sono down-regolate Marf (C) e Opa1 (D) il reticolo mitocondriale non è visibile e si osservano aggregati di mitocondri.

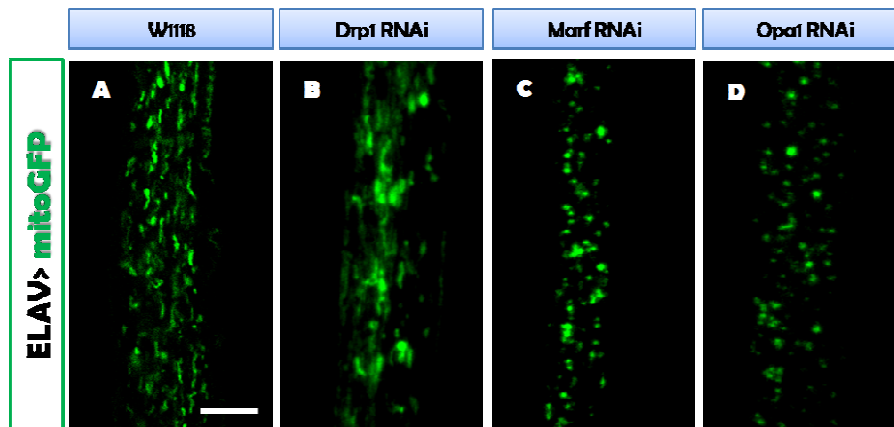


Fig. 24: Immagine di microscopia confocale di porzioni di nervi. I mitocondri sono marcati grazie all'espressione nel sistema nervoso di una GFP mitocondriale. Le immagini mostrano che, rispetto ad individui di controllo (A), i mitocondri appaiono frammentati nelle linee in cui l'espressione di Marf (C) e Opa1 (D) è ridotta. Nella linea UAS-Drp1 RNAi (B) i mitocondri appaiono invece di dimensioni maggiori rispetto al controllo W¹¹¹⁸ il network è paragonabile al controllo.

Sono stati analizzati quindi individui UAS-Marf RNAi, UAS-Drp1 RNAi e UAS-Opa1 RNAi, UAS-Drp1 RNAi caratterizzati dalla down regolazione simultanea di due geni. Dalle immagini in figura 26 è possibile osservare che, a differenza individui che esprimono UAS-Marf RNAi (Fig. 26B), in individui che esprimono UAS-Marf RNAi e UAS-Drp1 RNAi (Fig. 26C) i mitocondri lungo l'assone sono mediamente di dimensione superiore e nei corpi cellulari essi formano aggregati più piccoli (Fig. 25C) suggerendo che la perdita di Drp1 compensa parzialmente la perdita simultanea di Marf. Sorprendentemente nei corpi cellulari dei neuroni di individui che esprimono UAS-Opa1 RNAi e UAS-Drp1 RNAi la morfologia del network mitocondriale è molto simile ai controlli (Fig. 25E) e negli assoni la maggior parte dei mitocondri recupera le dimensioni se paragonati ai mitocondri di tessuti in cui è espresso esclusivamente UAS-Opa1 RNAi (Fig. 26E). Questi risultati dimostrano che l'alterazione della morfologia e del network mitocondriale neuronale causati dalla parziale perdita di funzione dei geni MARF e OPA1 che regolano la fusione delle membrane mitocondriali può essere recuperata, seppure con efficacia variabile, dalla simultanea riduzione di espressione del gene Drp1 che media il processo opposto di fissione mitocondriale.

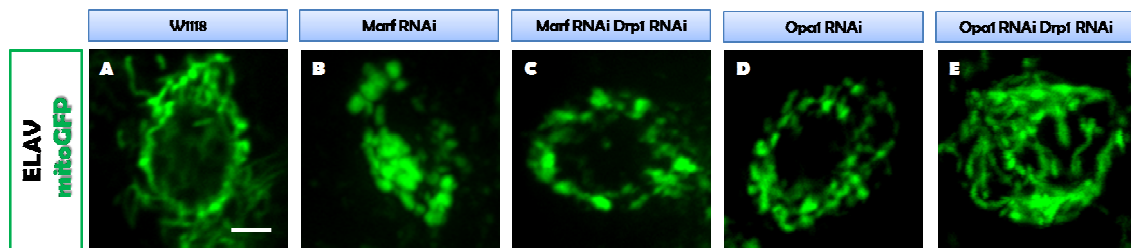


Fig. 25: Immagine di microscopia confocale di corpi cellulari di neuroni. I mitocondri sono marcati grazie all'espressione nel sistema nervoso di una GFP mitocondriale. Le immagini mostrano che in individui in cui l'espressione di Marf e Drp1 è ridotta simultaneamente (C) gli aggregati di mitocondri nei corpi cellulari sono di dimensioni più piccole rispetto a quelli osservati down-regolando Marf (B). Nella linea UAS-Opa1 RNAi UAS-Drp1 RNAi il network mitocondriale è paragonabile al controllo (E) e non si osservano aggregati. Scala: 5 μ m.

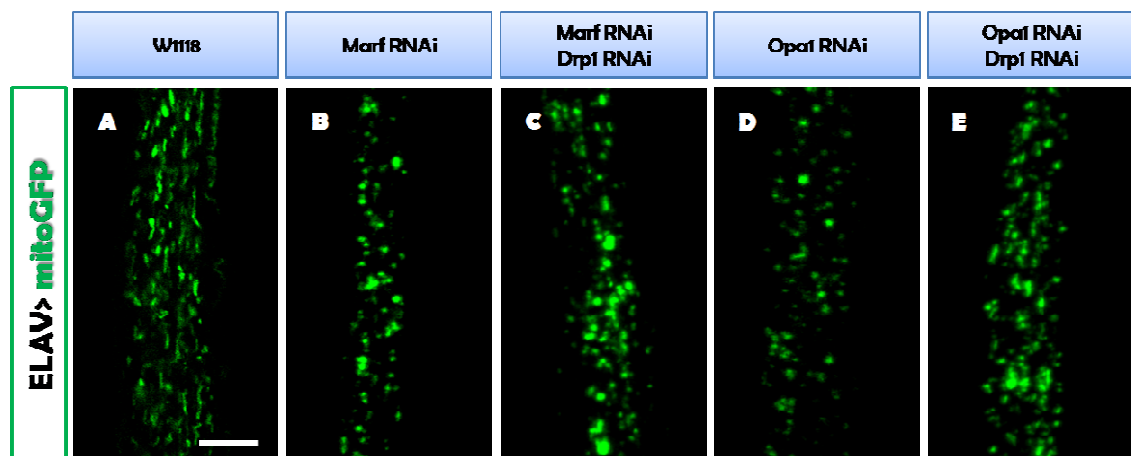


Fig. 26: Immagine di microscopia confocale di fasci di assoni. I mitocondri sono marcati grazie all'espressione nel sistema nervoso di una GFP mitocondriale. Le immagini mostrano che, rispetto ad individui in cui l'espressione Marf (B) e Opa1 (D) è ridotta, le linee che down-regolano contemporaneamente Marf e Drp1 (C) o Opa1 e Drp1 (E) presentano mitocondri di dimensioni medie superiori a quelle del fenotipo iniziale. Scala: 5 μ m.

Ulteriore conferma di questo si è avuta analizzando la vitalità di individui che esprimono UAS-Marf RNAi, UAS-Opa1 RNAi e UAS-Drp1 RNAi nel sistema nervoso. In particolare, solo il 4% degli individui attesi di genotipo UAS-Marf RNAi / ELAV-Gal4 raggiunge lo stadio di adulto. Questi individui sono di dimensioni più piccole rispetto ai

controlli, non volano, hanno difficoltà motorie e muoiono dopo pochi giorni dalla nascita. Analogamente, solo il 3% di individui UAS-Opa1 RNAi/+ ; ELAV-Gal4/+ sopravvive anche se muoiono immediatamente dopo essersi schiusi. Individui caratterizzati invece dalla down-regolazione di Drp1 (UAS-Drp1 RNAi/ELAV-Gal4) non hanno difetti nello sviluppo e raggiungono lo stadio adulto. Sorprendentemente, l'espressione di Drp1 RNAi in individui che simultaneamente esprimono Marf RNAi (UAS-Marf RNAi , UAS-Drp1 RNAi / ELAV-Gal4) sopprime parzialmente ma in modo significativo la letalità associata a Marf RNAi (Fig. 27). Inoltre, gli individui di genotipo UAS-Marf RNAi , UAS-Drp1 RNAi / ELAV-Gal4 hanno dimensioni paragonabili ai controlli, volano, si riproducono e vivono più a lungo. Al contrario, la down regolazione di Drp1 non ha alcun effetto significativo sulla letalità di Opa1 RNAi e, analogamente a al genotipo UAS-Opa1 RNAi/+ ; ELAV-Gal4/+, solo il 2% di individui UAS-Opa1 RNAi/+ ; UAS-Drp1 RNAi/ELAV-Gal4 sopravvive (Fig. 27).

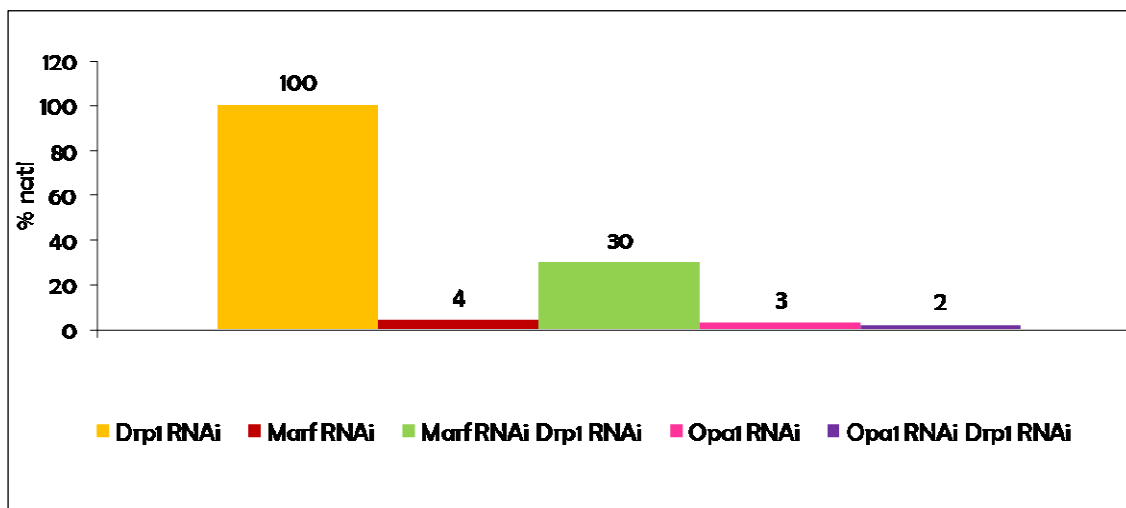


Fig. 27: Vitalità delle linee transgeniche di Drosophila. Il grafico mostra i dati di natalità delle linee UAS-RNAi analizzate. Si osserva una elevata mortalità in tutte le linee ad eccezione della linea in cui vi è ridotta espressione di Drp1 e della linea in cui Marf e Drp1 sono simultaneamente ridotte.

Per esaminare la morfologia mitocondriale in maggiore dettaglio è stata analizzata l'ultrastruttura dei corpi cellulari di cervelli di *Drosophila* mediante microscopia elettronica. Le linee UAS-RNAi sono state incrociate con il driver TUB-GAL4/TM6 e dalla progenie sono state selezionate larve al terzo stadio che quindi esprimono l'RNAi in modo ubiquitario. Da queste sono stati isolati i cervelli che sono stati sottoposti ad analisi di microscopia elettronica. A differenza del controllo, nei corpi cellulari delle linee

UAS-Marf RNAi (Fig. 28C, C') e UAS-Opa1 RNAi (Fig. 28E, E') i mitocondri sono danneggiati e contengono creste rigonfiate, indice di importanti difetti morfologici. In particolare si notano difetti nell'organizzazione strutturale interna delle creste che nella linea UAS-Opa1 dipende dalla mancata fusione delle membrane interne. Le creste appaiono spesso tubulari e l'architettura interna sembra essere discontinua. Al contrario, gli individui TUB-GAL4/UAS-Drp1 RNAi possiedono mitocondri di morfologia apparentemente normale (Fig. 28B, B').

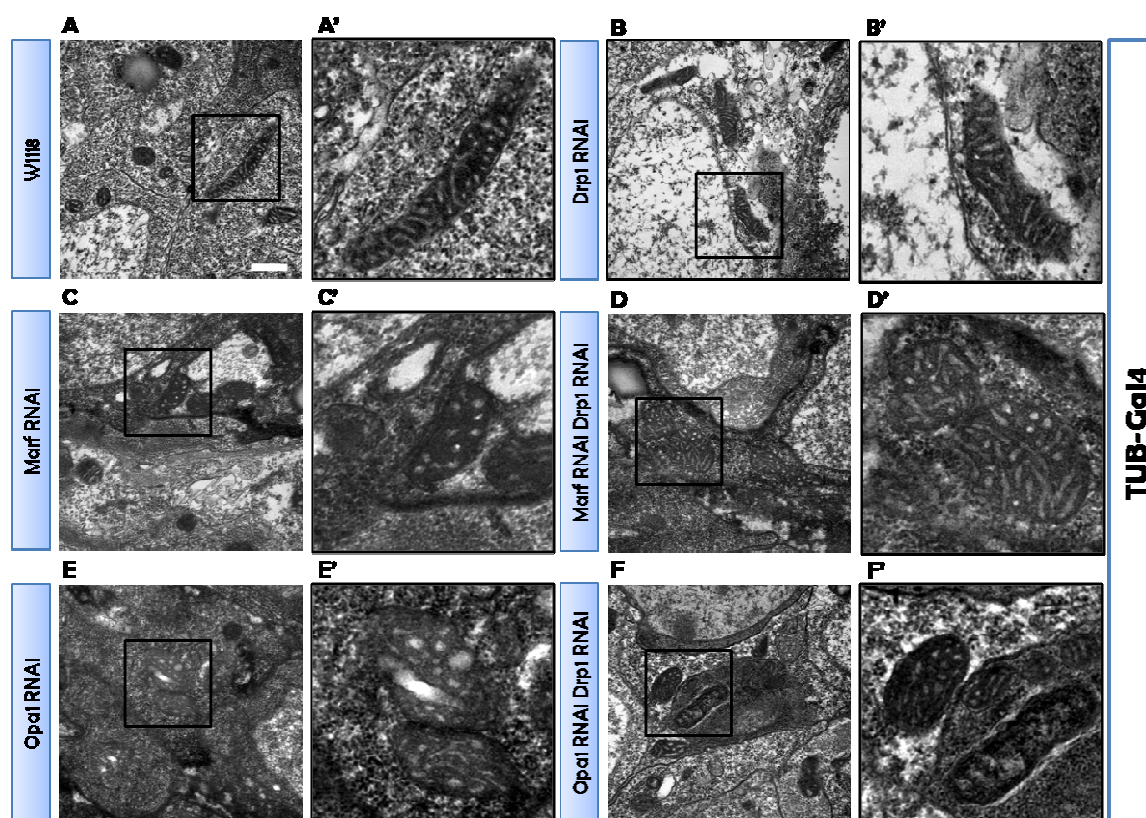


Fig. 28: Immagini di microscopia elettronica di corpi cellulari di neuroni. Le immagini mostrano l'ultrastruttura dei mitocondri nel soma di individui di controllo (A, A') e di individui in cui l'espressione di Drp1 (B, B'), Marf (C, C'), Marf e Drp1 (D, D'), Opa1 (E, E') e Opa1 e Drp1 (F, F') è ridotta. Per ciascun genotipo è riportato nell'immagine di destra (A'-F') il particolare di un mitocondrio. Ad eccezione di individui che down-regolano Drp1 (B, B'), che mostrano mitocondri con morfologia simile ai controlli (A-A'), in tutti gli altri genotipi sono evidenti difetti nella morfologia mitocondriale. Scala: 500 nm.

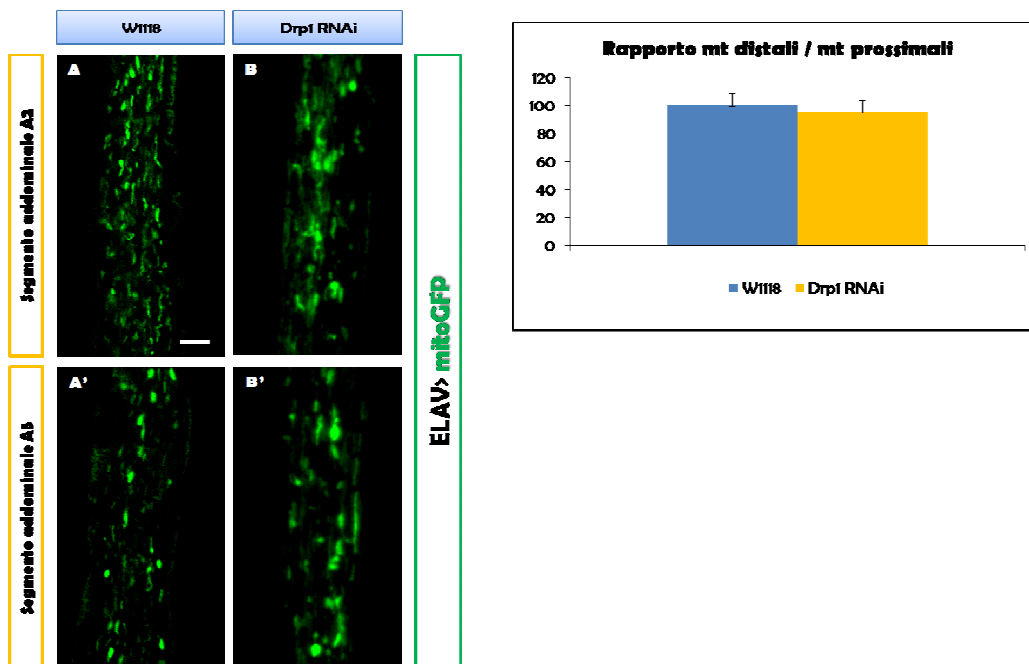
2. Analisi della distribuzione mitocondriale lungo l'assone

La neuropatia neurodegenerativa nota come di malattia di Charcot-Marie-Tooth è associata a mutazioni nel gene che codifica per Mfn2. Il meccanismo molecolare

attraverso il quale mutazioni nel gene Mfn2 causano la degenerazione delle fibre nervose non è chiaro. Tuttavia, sulla base di evidenze sperimentali ottenute in modelli cellulari, è stata avanzata l'ipotesi che la mutazione di Mfn2 produca una diminuzione del trasporto mitocondriale lungo l'assone con riduzione del numero di mitocondri nella porzione distale dell'assone e conseguente degenerazione. Poiché queste patologie si manifestano soprattutto in neuroni con assoni molto lunghi, abbiamo analizzato la distribuzione dei mitocondri in motoneuroni di *Drosophila*, caratterizzati appunto dalla presenza degli assoni più lunghi di questo organismo (assoni motori). Questo ci ha permesso di stabilire la relazione tra la distribuzione mitocondriale assonale e la distanza dal corpo cellulare. Le linee UAS-RNAi sono state incrociate con la linea UAS-mitoGFP/SM6; ELAV-Gal4/TM6 che contiene il promotore ELAV per l'espressione tessuto-specifica ed esprime una GFP mitocondriale per visualizzare il network mitocondriale. Le larve d'interesse sono state selezionate, dissezionate e marcate con anticorpo goat anti-Horseradish Peroxidase (HRP) coniugato con un fluoroforo Cy3. Per ciascun nervo è stato acquisito al microscopio confocale uno z-stack di una porzione di circa 40µm ed è stato analizzato con un software per l'analisi d'immagini (Volocity). È stata quantificata la quantità di mitocondri nella porzione prossimale (vicina al ganglio) e quella nella porzione distale (vicina alla giunzione neuromuscolare) del nervo e calcolato il rapporto tra i valori distali e prossimali per ciascun nervo.

Queste analisi dimostrano che la riduzione dell'espressione di Marf e Opa1 causa l'alterazione della distribuzione mitocondriale in assoni lunghi con diminuzione rispettivamente di circa il 60% e il 50 % della quantità di mitocondri osservata nei controlli nelle regioni distali rispetto quelle prossimali (Fig. 30). La down-regolazione di Drp1 invece non causa la modifica della distribuzione mitocondriale assonale ed il rapporto tra le regioni distali e prossimali del nervo equivale al controllo (Fig. 29).

Fig. 29: Distribuzione dei mitocondri in assoni lunghi. L'immagine di sinistra rappresenta porzioni di nervi prossimali (in alto) e distali al ganglio (in basso) all'interno dei quali sono distribuiti i mitocondri, marcati con GFP. Il grafico a destra mostra l'analisi dei dati in riferimento al rapporto tra la quantità di mitocondri presenti nelle regioni distali e quelli nelle regioni prossimali al ganglio, normalizzato sul volume totale dell'assone. Non si evidenziano particolari differenze fenotipiche tra la linea UAS-Drp1 e la linea di controllo. Scala: 5 µm. Le barre d'errore rappresentano ± SEM.



Come già descritto, la down-regolazione contemporanea di Marf e Drp1 o Opa1 e Drp1 riporta parzialmente o totalmente alle condizioni wilde type il fenotipo morfologico mitocondriale osservato nelle linee UAS-Marf RNAi e UAS-Opa1 RNAi. L'analisi dei dati sulla distribuzione mitocondriale negli assoni lunghi mostra, anche in questo caso, un miglioramento: la riduzione dell'espressione di Opa1 e Drp1 causa l'aumento della percentuale di mitocondri osservati nelle regioni del nervo distali con una diminuzione del 20% rispetto al controllo (Fig. 30). Questi risultati suggeriscono che l'alterazione della distribuzione dei mitocondri lungo l'assone dipende probabilmente da difetti nella morfologia e nella dimensione del mitocondrio. Quando invece Marf e Drp1 vengono down regolati simultaneamente la distribuzione dei mitocondri e la densità dei mitocondri distali rispetto ai prossimali risultano analoghe a quelle osservate nel caso della sola down regolazione di Marf (Fig. 30). I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che morfologia e dimensioni dei mitocondri siano un fattore determinante per il mantenimento della normale distribuzione assonale dei mitocondri.

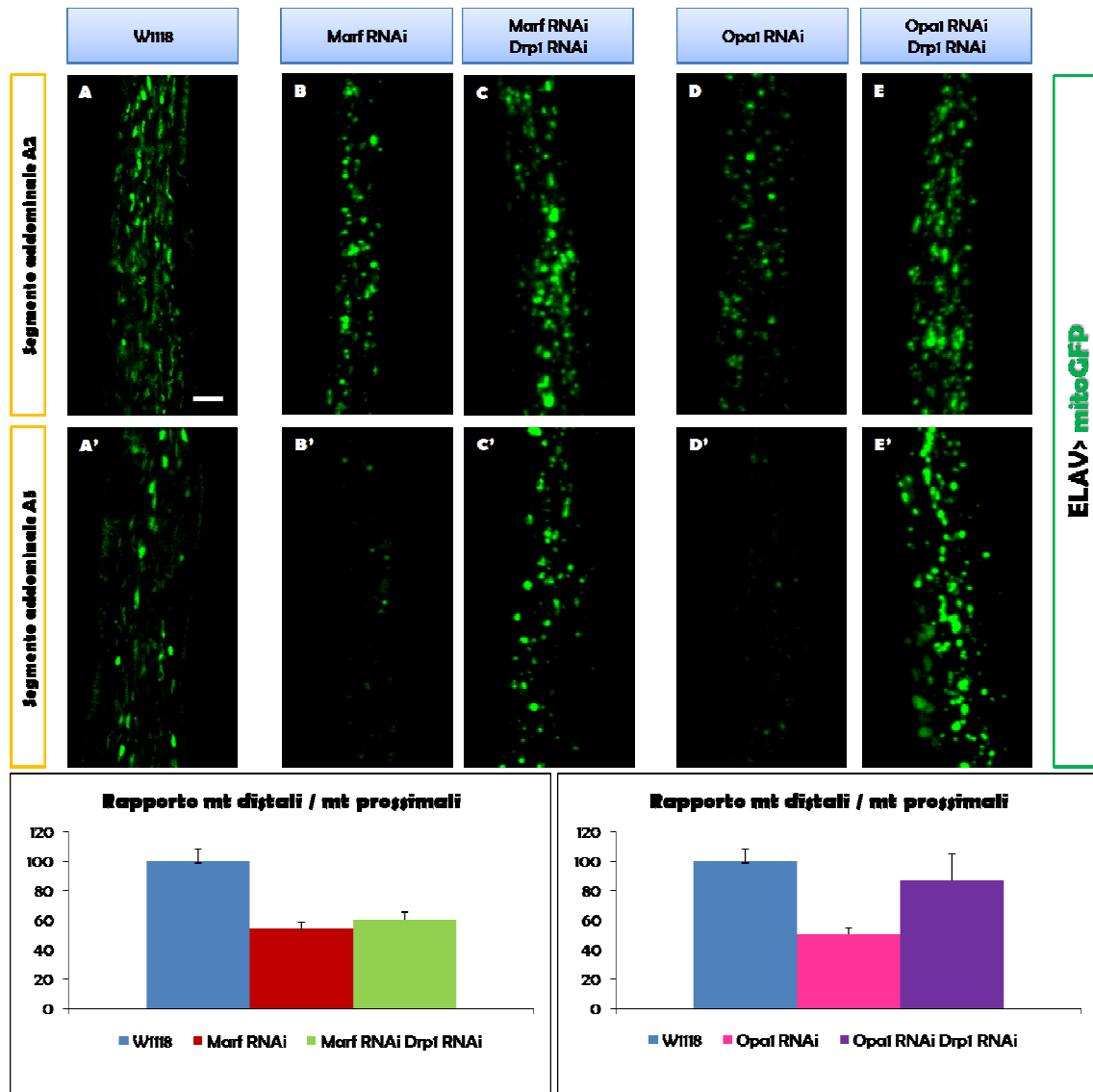


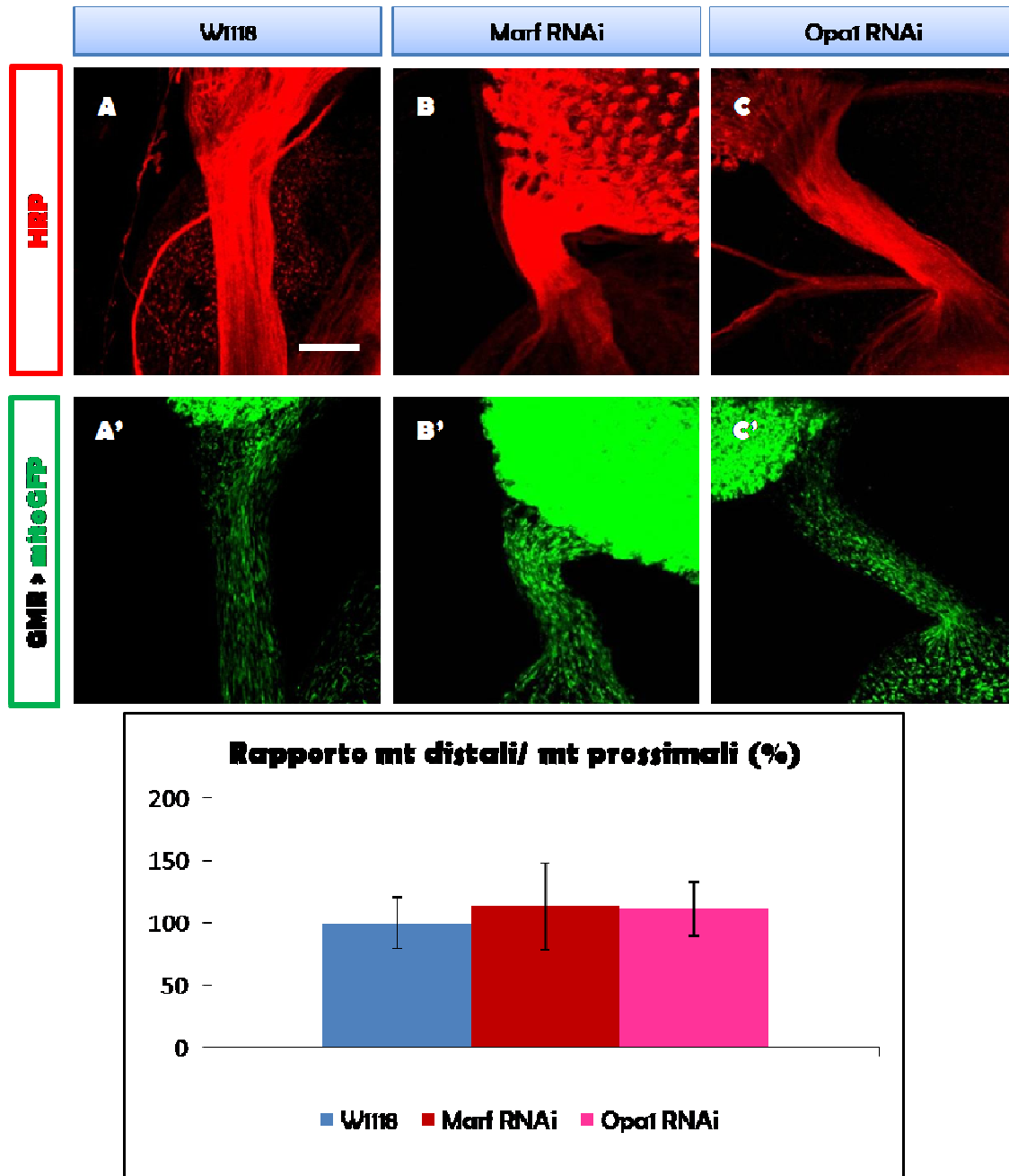
Fig. 30: Distribuzione dei mitocondri in assoni lunghi. Le immagini in alto rappresentano porzioni di nervi prossimali e distali al ganglio in cui sono distribuiti i mitocondri, visibili grazie all'espressione di una GFP mitocondriale. I grafici in basso mostrano l'analisi dei dati in riferimento al rapporto tra la quantità di mitocondri presenti nelle regioni distali e quelli nelle regioni prossimali al ganglio, normalizzato sul volume totale dell'assone: a sinistra si riferiscono alle linee UAS-Marf RNAi e UAS-Marf RNAi UAS-Drp1 RNAi, a destra invece alle linee UAS-Opa1 RNAi e UAS-Opa1 RNAi UAS-Drp1 RNAi. Dai grafici si osserva un'alterazione della distribuzione mitocondriale assonale in tutti i genotipi se paragonati al controllo e un notevole aumento della quantità di mitocondri che popola la regione distale in individui in cui l'espressione di Opa1 e Drp1 è ridotta. Scala: 5 μ m. Le barre d'errore rappresentano \pm SEM.

Per esaminare se i difetti nella distribuzione mitocondriale riguardano solo gli assoni lunghi abbiamo analizzato la distribuzione mitocondriale negli assoni dei fotorecettori che possono essere considerati corti (50 μ m) se paragonati a quelli dei motoneuroni (1,5-2mm). Per fare questo abbiamo generato i ricombinanti UAS-Marf RNAi , UAS-mitoGFP/TM6 e UAS-Opa1 RNAi , UAS-mitoGFP/SM6 che contengono due transegeni, uno per l'espressione dell'RNAi ed uno per esprimere una GFP mitocondriale e visualizzare i mitocondri. Le linee sono state incrociate con la linea GMR-Gal4/SM6 che contiene il promotore GMR, per l'espressione tessuto-specifica nell'occhio. Sfruttando la fluorescenza della GFP, nella progenie sono state selezionate larve al terzo stadio con il genotipo d'interesse nelle quali è stata analizzata la distribuzione mitocondriale negli assoni corti che collegano il disco immaginale dell'occhio al cervello. Come controllo abbiamo utilizzato la linea UAS-mitoGFP/TM6 incrociata per il promotore GMR-Gal4/SM6.

Per valutare la distribuzione mitocondriale, le larve sono state dissezionate e marcate con anticorpo goat anti-Horseradish Peroxidase (HRP) coniugato con fluoroforo Cy3 rosso che marca le membrane di tutte le cellule del sistema nervoso permettendo di visualizzare l'assone. Per ciascun nervo è stata acquisita al microscopio confocale una serie di immagini lungo l'asse z (z-stack) che sono state successivamente analizzate con Volocity, un software di analisi d'immagine che permette di misurare il volume totale dei mitocondri (volume di mitoGFP) e il volume totale della porzione di circa 5 μ di nervo considerata (volume di HRP) espressi in μ m³. E' stato quindi calcolato il rapporto tra i due volumi per normalizzare la quantità di mitocondri alla dimensione del nervo. Abbiamo quantificato sia la quantità di mitocondri nella porzione prossimale del nervo (vicina al disco immaginale dell'occhio) sia quella distale (vicina al ganglio). Infine abbiamo calcolato il rapporto tra i valori distali e prossimali per ciascun nervo. I dati di individui GMR-Gal4/+ ; UAS-Marf RNAi , UAS-mitoGFP/+ e UAS-Opa1 RNAi , UAS-mitoGFP / GMR-Gal4 (Fig. 31) confrontati con quelli dei controlli dimostrano che down-regolando Marf o Opa1 la distribuzione dei mitocondri in assoni corti rimane inalterata, confermando l'ipotesi che la distribuzione mitocondriale è alterata solo nel caso in cui i mitocondri debbano percorrere lunghe distanze.

Fig. 31: Distribuzione dei mitocondri in assoni corti dell'occhio. La figura in alto mostra immagini di microscopia confocale di assoni corti. Si osservano le membrane neuronali marcate con anticorpo α -HRP rosso (A, B, C) e la distribuzione mitocondriale assonale, visibile grazie all'espressione di una GFP mitocondriale (A', B', C'). La figura in basso

rappresenta il grafico di analisi dei dati: la densità mitocondriale lungo assoni corti rimane inalterata in linee che down-regolano Marf o Opa1. Scala: 20 μ m. Le basse d'errore rappresentano \pm SEM.

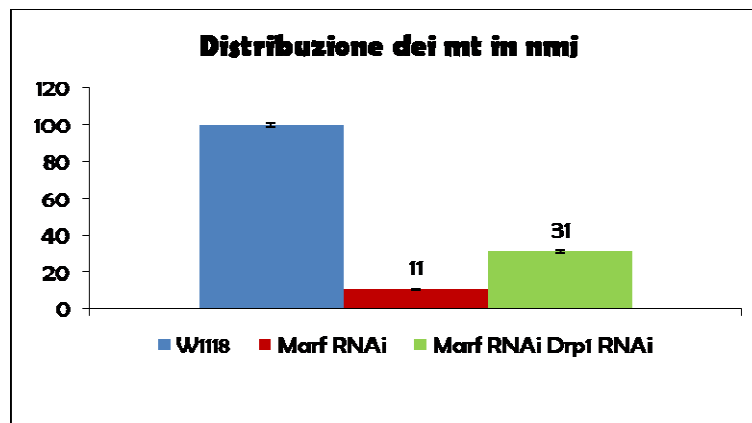
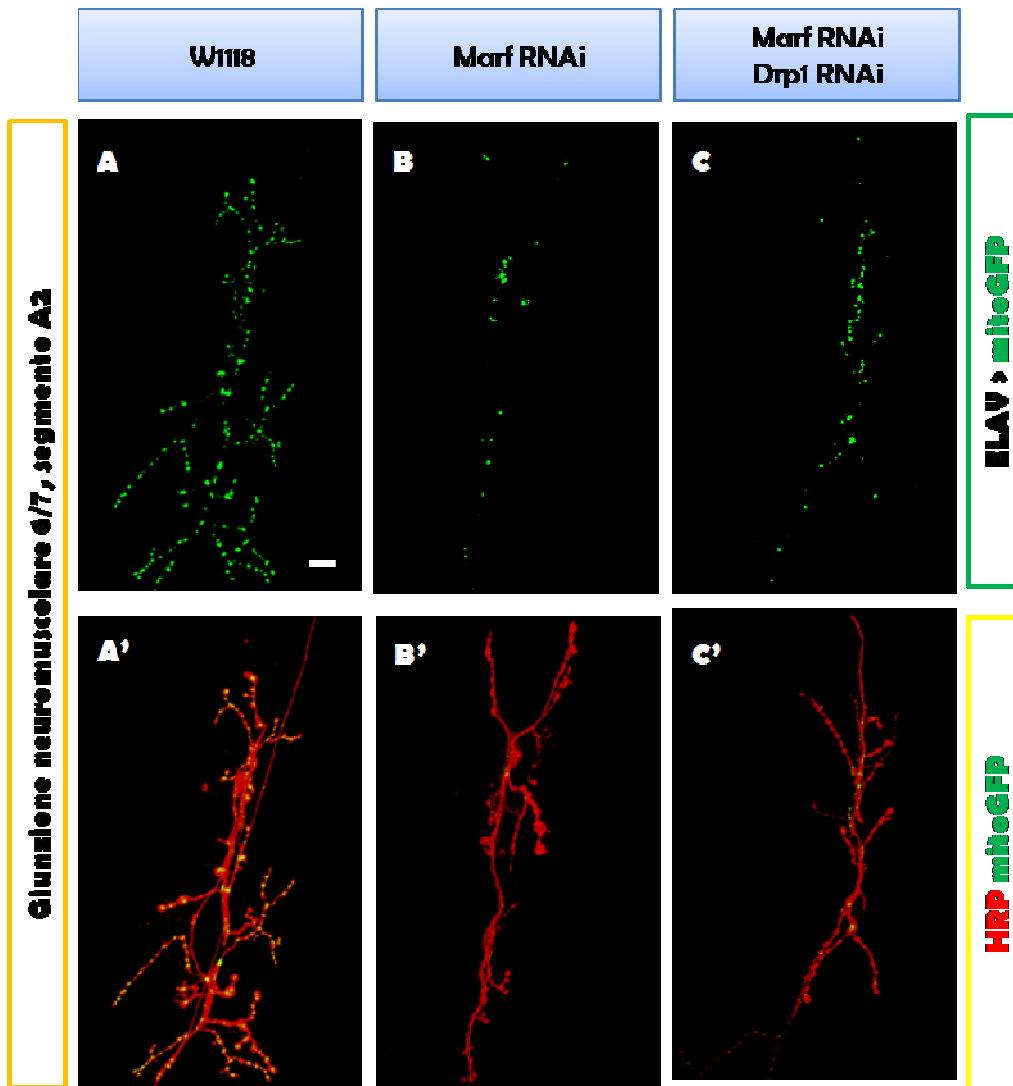


3. Analisi della distribuzione mitocondriale nella giunzione neuromuscolare

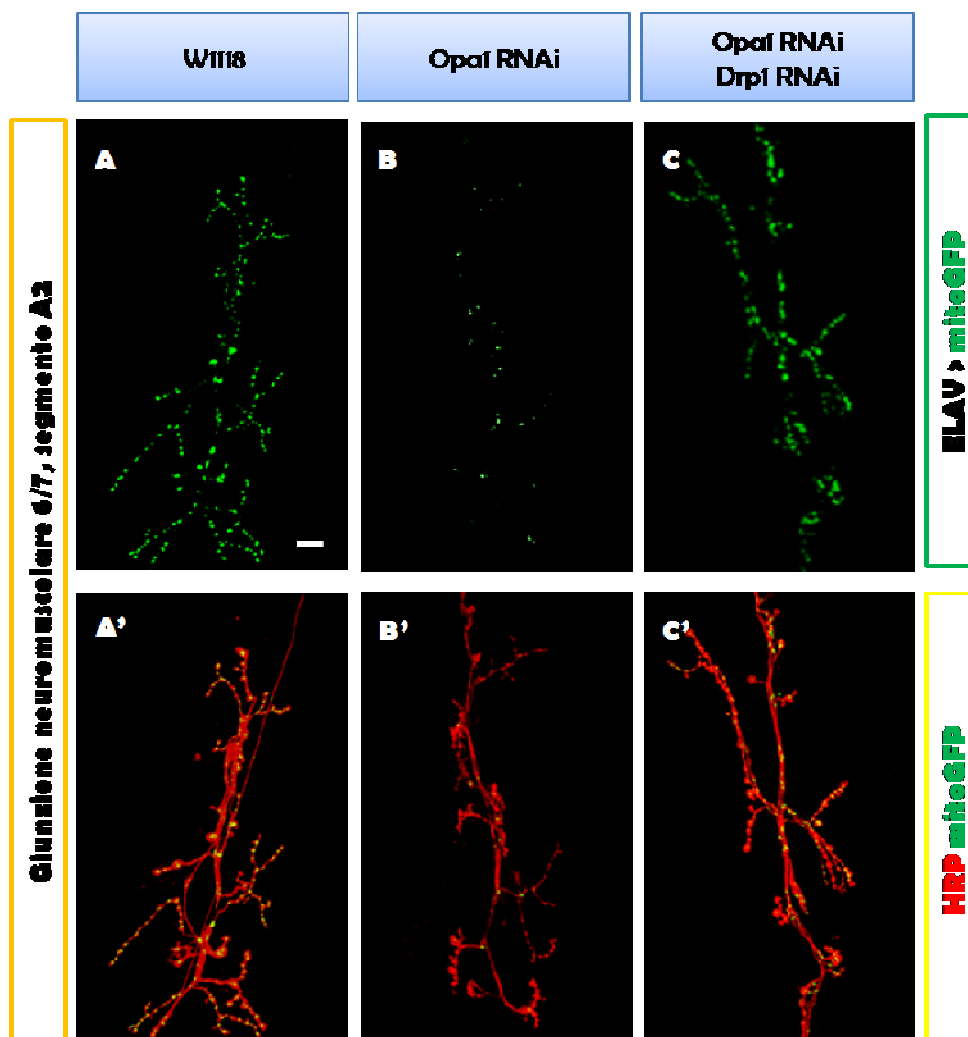
Il decremento del numero di mitocondri presenti nelle regioni distali rispetto a quelle prossimali suggerisce che la lunghezza dell'assone influisce sul popolamento della sinapsi neuromuscolare da parte dei mitocondri. È stata valutata quindi la distribuzione

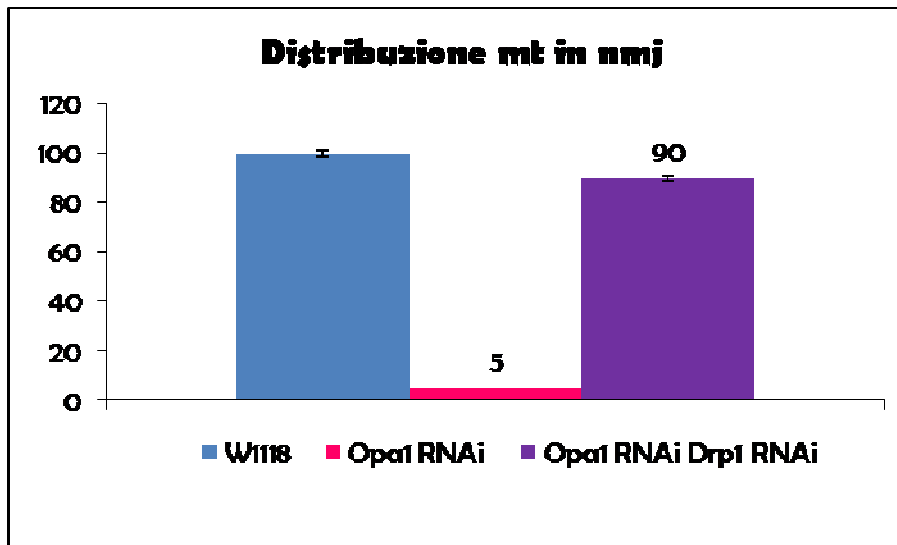
mitocondriale nelle giunzioni neuromuscolari (NMJs). Le linee UAS-Marf RNAi, UAS-Marf RNAi , UAS-Drp1 RNAi/TM6, UAS-Opa1 RNAi e UAS-Opa1 RNAi ; UAS-Drp1 RNAi sono state incrociate con la linea UAS-mitoGFP/SM6; ELAV-Gal4/TM6 e nella progenie sono state selezionate larve al terzo stadio del genotipo d'interesse sulle quali è stata analizzata la distribuzione mitocondriale in giunzione. Sono state esaminate le giunzioni 6/7 del segmento addominale A2 e A3. I risultati evidenziano una notevole deplezione della quantità di mitocondri in NMJs in individui UAS-mitoGFP/+;ELAV-Gal4/UAS-Marf RNAi (Fig. 32B) e UAS-Opa1 RNAi/UAS-mitoGFP;ELAV-Gal4/+ (Fig. 33B) rispetto ai controlli (Fig. 32A, Fig. 33A): solamente il 11% dei mitocondri è presente in NMJs di individui in cui Marf è down-regolato (Fig. 32), e il 5% in NMJs di individui in cui vi è una riduzione dell'espressione di Opa1 (Fig. 33). In accordo con quanto osservato nelle analisi precedenti, la down-regolazione simultanea di Marf e Drp1 causa un leggero recupero della percentuale di mitocondri che raggiunge la NMJs con un aumento di circa il 20% rispetto al fenotipo della linea UAS-Marf RNAi da sola (Fig. 32). La riduzione simultanea del livello di espressione di Opa1 e Drp1 invece causa un recupero pressoché completo del numero di mitocondri presenti in giunzione (Fig. 33). I risultati ottenuti confermano che il recupero della morfologia mitocondriale è indispensabile per una corretta distribuzione dei mitocondri lungo l'assone e alle sinapsi.

Fig. 32: Distribuzione dei mitocondri nella giunzione neuromuscolare. Le immagini di microscopia confocale in alto mostrano NMJs 6/7 del segmento addominale A2. La morfologia della NMJs è stata evidenziata marcando le membrane neuronali con anticorpo α -HRP rosso e i mitocondri visibili per l'espressione di una GFP mitocondriale. Il grafico in basso rappresenta la distribuzione mitocondriale sinaptica espressa in percentuale e normalizzata per il volume totale della giunzione. I dati mostrano una differenza significativa tra la densità di mitocondri che popola la giunzione in individui Marf RNAi (B) rispetto ai controlli (A). La simultanea down-regolazione di Marf e Drp1 aumenta leggermente la popolazione mitocondriale in giunzione (C). Scala: 20 μ m. Le barre d'errore rappresentano \pm SEM.



*Fig. 33: Distribuzione dei mitocondri nella giunzione neuromuscolare. Le immagini di microscopia confocale in alto mostrano NMJs 6/7 del segmento addominale A2. La NMJs è stata marcata con anticorpo α -HRP rosso e i mitocondri visibili per l'espressione di una GFP mitocondriale. Il grafico in basso presenta i dati ottenuti, espressi in percentuale, della densità di mitocondri alla NMJs normalizzata per il volume totale della giunzione. I dati mostrano un'alterazione della distribuzione mitocondriale in sinapsi in individui *Opa1 RNAi* (B) rispetto ai controlli (A). La riduzione dell'espressione di *Opa1* e *Drp1* aumenta notevolmente la popolazione mitocondriale in giunzione (C), che risulta poco più inferiore ai controlli. Scala: 20 μ m. Le barre d'errore rappresentano \pm SEM.*

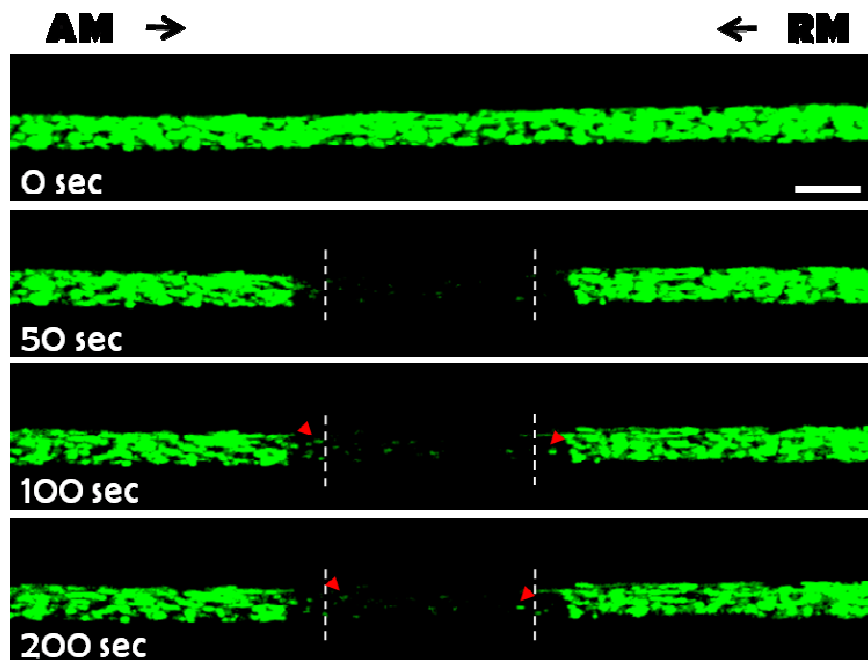




1.4. Traffico mitocondriale

Come è noto dalla letteratura, i mitocondri si muovono lungo l'assone grazie a proteine motore che permettono loro di viaggiare in senso anterogrado e retrogrado. I dati sopra descritti indicano che il numero di mitocondri presenti nelle giunzioni neuromuscolari di individui in cui Marf o Opa1 sono down-regolati è ridotto. L'ipotesi proposta per spiegare questo fenomeno è che la diminuzione di densità mitocondriale sinaptica osservata nelle linee UAS-Marf RNAi e UAS-Opa1 RNAi sia connessa alla riduzione del traffico mitocondriale anterogrado o retrogrado. L'accumulo di aggregati mitocondriali nel soma e la deplezione di mitocondri in giunzione fa supporre che si verifichi o un blocco del trasporto anterogrado con aumento del numero di mitocondri nel corpo cellulare dei neuroni ed eccessiva aggregazione o un'alterazione del trasporto retrogrado, che si esplicano in una mancanza di mitocondri alla sinapsi e accumulo nel soma.

Fig. 34: Trasporto mitocondriale in motoneuroni li larva dopo il photobleaching. Le immagini mostrano sezioni di circa 160 μm di lunghezza di motoneuroni in cui sono visibili i mitocondri, marcati con GFP. Le frecce in alto indicano il movimento dei mitocondri in senso anterogrado (AM) e in senso retrogrado (RM) mentre le frecce rosse mostrano specifici mitocondri mobili. La zona centrale priva di mitocondri corrisponde alla regione sottoposta a bleaching di circa 40 μm e le linee tratteggiate il limite massimo che ciascun mitocondrio deve superare per poter essere considerato AM e RM. Il movimento dei mitocondri è stato valutato per un tempo di 200 s. Scala: 10 μm .



Per studiare il trafficking mitocondriale, le linee UAS-Marf RNAi, UAS-Marf RNAi , UAS-Drp1 RNAi/TM6, UAS-Opa1 RNAi e UAS-Opa1 RNAi ; UAS-Drp1 RNAi sono state incrociate con la linea UAS-mitoGFP/SM6; ELAV-Gal4/TM6 è stato analizzato nella progenie con genotipo d'interesse il movimento mitocondriale in vivo con l'uso del microscopio confocale. Per esaminare il traffico mitocondriale lungo l'assone è stata usata la tecnica del photobleaching della GFP mitocondriale (eliminazione del segnale della GFP in seguito a illuminazione prolungata con il laser). Per eseguire questo esperimento è stato fatto il photobleaching di una porzione di assone della lunghezza di 40 μm . Questo ha permesso di visualizzare, in un intervallo di tempo di 200 s, i mitocondri GFP positivi provenienti dalle aree di assone adiacenti non sottoposte a photobleaching. Sono stati contati i mitocondri che si muovono in senso anterogrado e retrogrado considerando solo quelli visibili in modo costante per un tratto di circa 5 μm (come indicato dalla linea tratteggiata in Fig. 34). Il rapporto tra mitocondri anterogradi e retrogradi è stato normalizzato sul numero totale di mitocondri presenti nell'area prima del photobleaching. Tale valore è stato ottenuto dall'analisi con Velocity di uno z-stack della zona presa in considerazione per il bleaching.

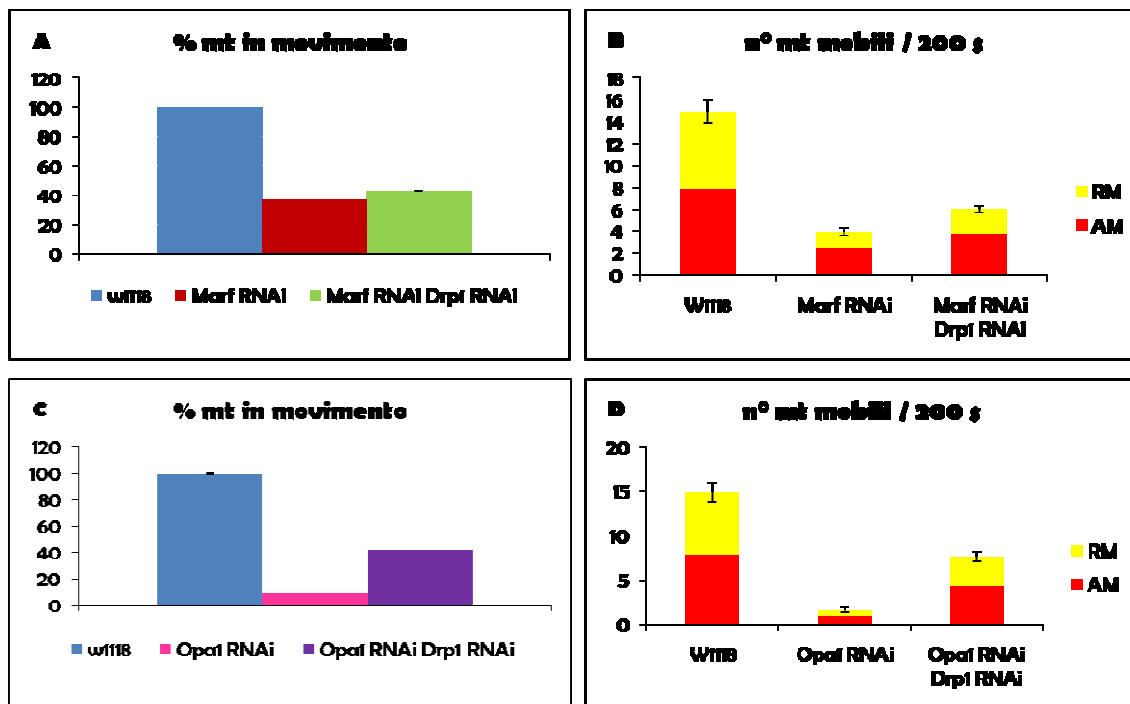


Fig. 35. Analisi del trafficking mitocondriale assonale in vivo. I grafici a sinistra rappresentano le percentuali dei mitocondri in movimento lungo l'assone mentre quelli di destra il numero assoluto di mitocondri mobili. La percentuale è stata calcolata valutando i mitocondri anterogradi e retrogradi in movimento in una regione sottoposta a bleaching per un tempo totale di 200 s. La riduzione dell'espressione di Marf (A) e Opa1 (C) causa un drastico blocco del trasporto mitocondriale assonale. Il ripristino parziale della motilità mitocondriale si verifica nella linea UAS-Opa1 RNAi; UAS-Drp1 RNAi. In tutti i genotipi (B, D) non si osservano differenze significative nel numero assoluto di mitocondri anterogradi e retrogradi. Le barre d'errore rappresentano \pm SEM.

I dati riportati in figura 35A mostrano che, in individui con genotipo UAS-mitoGFP/+; ELAV-Gal4/UAS-Marf RNAi, la percentuale totale di mitocondri in movimento si riduce rispetto ai controlli di circa il 65%. Anche la down-regolazione di Opa1 causa una riduzione della percentuale di mitocondri in movimento che risulta essere più severa rispetto alla linea UAS-Marf RNAi: soltanto il 10% dei mitocondri si muove lungo l'assone (Fig. 35C). Con il recupero della morfologia mitocondriale nella linea UAS-Opa1 RNAi; UAS-Drp1 RNAi si verifica anche l'aumento significativo della percentuale di mitocondri mobili che passa da un 10% ad un 40% (Fig. 35C). Anche la riduzione

contemporanea dell'espressione di Marf e Drp1 causa un leggero recupero della motilità mitocondriale, con aumento della percentuale di mitocondri in movimento del 10% rispetto al fenotipo osservato nella linea UAS-Marf RNAi. (Fig. 35A). In tutti i genotipi analizzati non si osservano particolari differenze nel numero assoluto di mitocondri anterogradi e retrogradi e la diminuzione dei mitocondri mobili in entrambi i sensi è paragonabile ai controlli (Fig. 35B,D). La riduzione del trasporto mitocondriale non dipende quindi da un blocco del trasporto anterogrado o retrogrado ma da una diminuzione generale nel numero di mitocondri trasportati. È probabile che Marf e Opa1 non esercitino un ruolo diretto nel trasporto mitocondriale assonale ma che invece questo trasporto dipenda dall'alterata morfologia mitocondriale che deriva dalla down-regolazione di Marf e Opa1.

È stato ipotizzato un ruolo diretto di Mfn2 nel trasporto mitocondriale mediante l'interazione con Miro, proteina adattatrice coinvolta nel trasporto mitocondriale assonale anterogrado. Esperimenti di co-immunoprecipitazione di mitofusina con le diverse proteine coinvolte nel trasporto mitocondriale dimostrano che mitofusina interagisce direttamente con Miro supportando l'idea che l'alterazione del trafficking mitocondriale osservata in patologie in cui mitofusina è assente sia dovuta alla mancanza di tale interazione (Misko, 2010). Per verificare questa ipotesi, abbiamo trasfettato le cellule Cos7 con costrutti che permettono l'espressione transiente di Marf e Miro, effettuato un test di co-immunoprecipitazione e analizzato i precipitati con Western Blot. Le cellule sono state trasfettate con un plasmide che esprime Marf fusa con il tag V5 per il riconoscimento della proteina da parte di anticorpi α -V5 e con un plasmide che esprime la proteina Miro fusa con GFP per la sua diretta visualizzazione. Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lisate e i lisati proteici sottoposti a co-immunoprecipitazione con biglie magnetiche α -proteina A alle quali è stato legato precedentemente l'anticorpo α -GFP. Come è possibile vedere in figura 36 Marf e Miro non co-immunoprecipitano: questo dimostra che, pur alterando il traffico mitocondriale assonale, Marf non interagisce in modo diretto con Miro supportando l'idea che l'alterazione del traffico mitocondriale assonale e della distribuzione dei mitocondri negli assoni lunghi non sia dovuta a difetti del meccanismo di trasporto dei mitocondri.

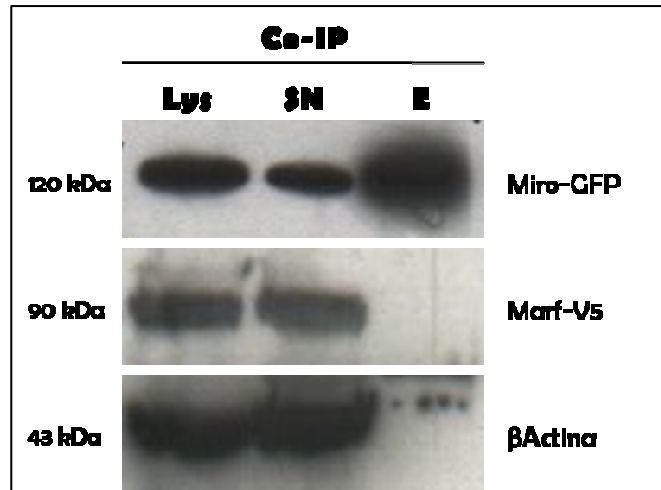


Fig. 36: Wester Blot di immunoprecipitazione di Marf e Miro. Nel blot sono stati caricati i lisati proteici (LYS), le proteine non legate (SN) e l'eluato (E). Sono visibili tre bande, una al peso molecolare di 90 kDa che corrisponde a Marf V5, una al peso molecolare di 120kDa riferita a Miro-GFP e una a 43 kDa che corrisponde al gene di controllo β actina. Dal blot si dimostra che Marf e Miro non co-immunoprecipitano.

5. Funzione mitocondriale

Molto spesso ad alterazioni della morfologia dei mitocondri viene associata una ridotta funzionalità mitocondriale. Questo perché i complessi proteici appartenenti alla catena di trasporto degli elettroni sono localizzati a livello delle membrane mitocondriali interne e un'alterazione dell'ultrastruttura mitocondriale potrebbe causare difetti nell'assemblaggio e nella funzionalità dei complessi stessi. Gli effetti osservati in seguito alla down-regolazione di Marf, Opa1 e Opa1 Drp1 sulla vitalità degli individui suggeriscono che la letalità al terzo stadio larvale sia dovuta ad alterazioni della funzionalità mitocondriale, che è indipendente dalla morfologia stessa del mitocondrio. L'energia prodotta da questi organelli infatti è necessaria per la funzionalità cellulare e per lo sviluppo dell'individuo ed alterazioni in tali processi potrebbero essere alla base della letalità precoce. Gli effetti del silenziamento di MARF, OPA1 e DRP1 sull'efficienza dei mitocondri di larve di *Drosophila* sono stati analizzati misurando il consumo di ossigeno totale delle larve, le attività enzimatiche dei singoli complessi respiratori e la capacità di sintesi di ATP dei mitocondri isolati in presenza di substrati esogeni.

Le linee UAS-Drp1 RNAi, UAS-Marf RNAi, UAS-Marf RNAi , UAS-Drp1 RNAi/TM6, UAS-Opa1 RNAi e UAS-Opa1 RNAi ; UAS-Drp1 RNAi sono stata incrociate con il driver TUB-

GAL4/TM6 e dalla progenie sono state selezionate larve al terzo stadio con genotipo d'interesse.

La valutazione della capacità respiratoria è stata effettuata su omogenati di larve intere ed è stata valutata la capacità di consumo di ossigeno in condizioni basali e la respirazione extramitocondriale, in seguito all'aggiunta di rotenone e antimicina A.

L'analisi dei dati in figura 37 mostra che in individui cui Marf e Opa1 sono down-regolati singolarmente, la capacità respiratoria mitocondriale è ridotta di circa la metà rispetto ad individui di controllo. Ciò non si verifica in individui con genotipo UAS-Drp1 RNAi/TUB-Gal4, i quali consumano ossigeno con la stessa efficienza dei controlli. La riduzione simultanea di Opa1 e Drp1 non altera il fenotipo di Opa1. Una delle ipotesi è che questo fenomeno dipenda dal fatto che la riduzione di espressione di Opa1 causa alterazioni dell'ultrastruttura delle membrane intere mitocondriali con conseguente disorganizzazione dei complessi della catena respiratoria e difetti nel trasporto dei mitocondri. Come ci si aspettava dai dati di vitalità, in individui con genotipo UAS-Marf RNAi , UAS-Drp1 RNAi/TUB-Gal4 si osserva un totale recupero delle capacità respiratorie: in particolare la down-regolazione di Marf causa difetti di fusione delle membrane esterne mitocondriali che, pur alterando la morfologia delle creste mitocondriali come osservato negli esperimenti di microscopia elettronica, non è probabilmente direttamente collegata con la localizzazione e l'assemblaggio dei complessi enzimatici.

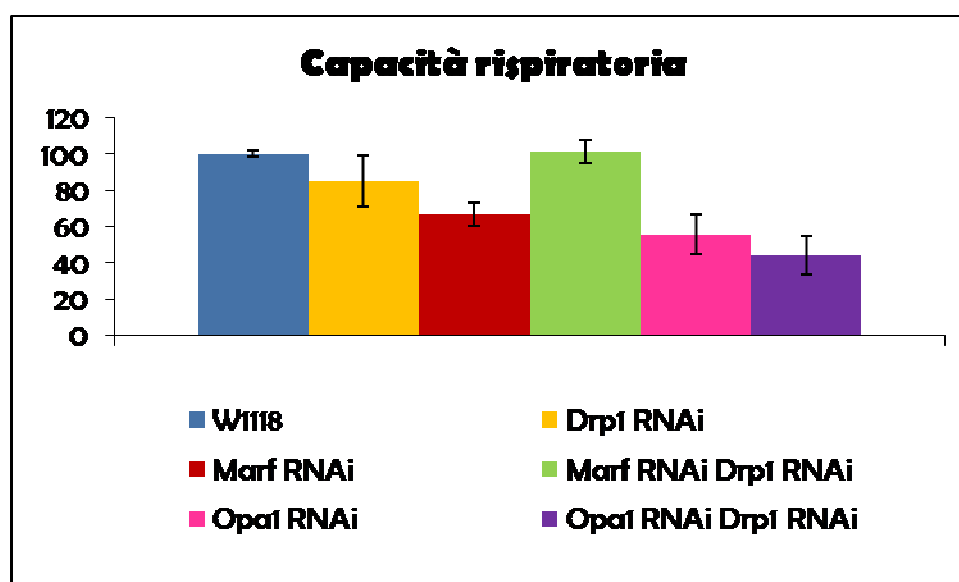


Fig. 37: Analisi di respirazione mitocondriale. Il grafico mostra in percentuale, la capacità di consumo di ossigeno normalizzata sul peso totale delle larve analizzate. Si

osserva una riduzione di circa il 50% in individui in cui Marf o Opa1 sono down-regolati rispetto ad individui W¹¹⁸. Non ci sono differenze significative tra i controlli e individui con ridotta espressione di Drp1. Il silenziamento accoppiato di Marf e Drp1 causa un recupero totale della capacità respiratoria mitocondriale, che non si osserva in individui che esprimono ubiquitariamente Opa1 RNAi e Drp1 RNAi. Le barre d'errore rappresentano \pm SEM.

La ridotta capacità respiratoria è spesso associata alla diminuzione dell'attività enzimatica dei complessi della catena di trasporto degli elettroni. Questo può essere dovuto a difetti nell'assemblaggio dei complessi e conseguente malfunzionamento o inattività o alla riduzione di espressione di proteine che appartengono al pathway della respirazione mitocondriale, che comprendono i complessi stessi e i loro substrati. Per determinare l'attività redox dei complessi respiratori sono stati isolati i mitocondri mediante omogenizzazione meccanica delle larve e centrifugazione differenziale. Sono state misurate le attività del complesso I, del complesso III e del complesso IV normalizzate sull'attività della citrato sintasi. L'attività della citrato sintasi viene universalmente accettata come indice della massa mitocondriale, essendo questo un enzima codificato dal nucleo e presente nella matrice. La normalizzazione delle attività di sintesi dell'ATP su quella della citrato sintasi permette di confrontare la capacità del mitocondrio di produrre ATP a parità di massa mitocondriale.

I dati in figura 38 mostrano una drastica riduzione dell'attività enzimatica del complesso I in tutti i genotipi, ad eccezione del genotipo UAS-Drp1 RNAi/TUB-Gal4 in cui è paragonabile al controllo. In particolare individui in cui è ridotta l'espressione di Marf e Opa1 l'attività redox del complesso I si riduce dell'80% rispetto al controllo W¹¹⁸. Questi dati dimostrano che il complesso I è un fattore limitante per individui che down-regolano singolarmente Marf e Opa1. Anche il silenziamento combinato di Marf e Drp1 o Opa1 e Drp1 causa la riduzione di attività enzimatica e questo conferma che il difetto enzimatico permane, nonostante la morfologia mitocondriale sia parzialmente ripristinata in questi individui. In tutti i genotipi, ad eccezione di UAS-Drp1 RNAi/TUB-Gal4 e UAS-Opa1 RNAi ; UAS-Drp1 RNAi/TUB-Gal4, il grafico mostra una riduzione di circa il 50% dell'attività del complesso III. La stessa condizione si verifica se si considera l'attività redox del complesso IV, anche se in questo caso la diminuzione è minima rispetto al controllo. Il recupero dell'attività enzimatica del complesso III e IV in individui UAS-Opa1 RNAi ; UAS-Drp1 RNAi è controversa con quanto osservato negli esperimenti di respirazione mitocondriale. Una possibile spiegazione è che, considerando che

l'agente limitante nella respirazione è il complesso I, possono innescarsi dei meccanismi di compensazione interna per bilanciare la mancata attività del complesso I, con conseguente aumento dell'attività di altre proteine.

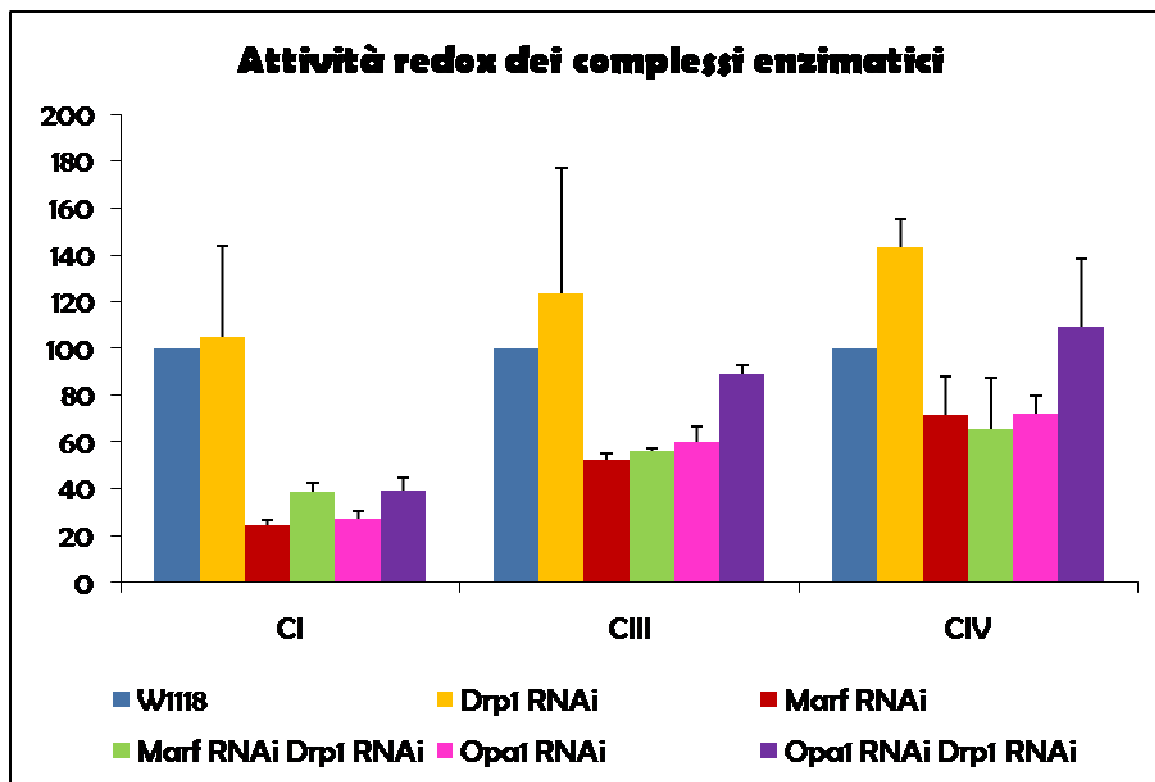


Fig. 38: Grafico a barre dell'attività redox dei complessi enzimatici della catena di trasporto degli elettroni. L'immagine mostra le attività redox dei complessi I, III e IV normalizzati sull'attività della citrato sintasi. Si osserva la notevole riduzione dell'attività del complesso I in tutti i genotipi, ad eccezione di individui che esprimono Drp1 RNAi e una diminuzione più lieve delle attività dei complessi III e IV. Le barre d'errore rappresentano \pm SEM.

La fosforilazione ossidativa è il processo attraverso il quale si forma ATP in seguito al trasferimento di elettroni dal NADH o dal FADH₂ all'ossigeno molecolare (O₂), mediante i complessi enzimatici localizzati sulla membrana mitocondriale interna. La riduzione di attività del complesso I nella maggior parte delle linee analizzate fa ipotizzare che possano esserci cambiamenti nella produzione delle molecole di ATP durante il processo ossidativo. La funzionalità della fosforilazione ossidativa è stata determinata misurando la velocità di sintesi di ATP, utilizzando substrati che producono NADH per il complesso I (piruvato/malato), oppure utilizzando il succinato

come donatore di elettroni per il complesso II. I dati sono stati espressi in percentuale come rapporto tra l'attività specifica di sintesi di ATP e l'attività specifica della citrato sintasi.

I risultati in figura 39 dimostrano che la riduzione di espressione di Drp1 non altera la capacità di produrre energia. Questo dato conferma pienamente i dati precedenti di respirazione mitocondriale in cui non si osservano difetti evidenti e attività redox dei complessi enzimatici paragonabili ai controlli. La down-regolazione di Marf provoca un calo significativo della sintesi di ATP tramite CI (80%) e abbastanza netto anche tramite CII (50%). La riduzione di produzione di ATP mediante la via malato/piruvato è giustificata dal fatto che l'attività del complesso I è minima ed è limitante per la sintesi. Il silenziamento di Opa1 invece causa la diminuzione mediata da complesso I e non da complesso II. Nel primo caso la riduzione è dovuta alla bassa attività del complesso I, mentre nel secondo caso la velocità di sintesi di ATP mediata da succinato non è alterata rispetto ai controlli probabilmente perchè tale riduzione non ha ancora superato i livelli soglia per poter causare difetti nella produzione di ATP. La simultanea espressione di Marf RNAi e Drp1 RNAi o Opa1 RNAi Drp1 RNAi causa effetti molto simili. Si osserva, infatti una riduzione della velocità di sintesi di ATP mediata da complesso I e da complesso II in entrambi i casi. In individui con ridotta espressione di Opa1 e Drp1 questo fenomeno è spiegabile per la diminuzione di attività del complesso I. Meno giustificabile invece è la diminuzione di produzione di ATP mediata da succinato in individui invece che down-regolano Marf e Drp1 in quanto non giustifica l'aumento del numero di nati che presentano questo genotipo e con il completo recupero delle capacità respiratorie mitocondriale. Una possibile spiegazione che giustifichi la discrepanza di questi risultati potrebbe riguardare le diverse condizioni sperimentali in cui è stata misurata l'attività enzimatica, la sintesi di ATP e la respirazione mitocondriale. Infatti, gli esperimenti di attività e sintesi di ATP sono effettuati in condizioni saturanti di substrati e quindi si osserva la massima attività enzimatica. Diversamente, per il consumo di ossigeno è stata misurata la diminuzione della concentrazione di ossigeno derivato dall'ossidazione endogena dei substrati di cui non conosciamo le concentrazioni che potrebbero essere lontane dalla velocità massima degli enzimi e quindi ridurre le differenze fra le diverse linee di *Drosophila*. Inoltre, negli esperimenti in cui è stato misurato il consumo di ossigeno endogeno, la respirazione avviene simultaneamente tramite substrati che possono donare elettroni ai vari complessi della catena respiratoria (complesso I, II e deidrogenasi chinone dipendenti) e

in queste condizioni le vie di ossidazione potrebbero compensare eventuali difetti messi in evidenza mediante gli esperimenti in condizioni saturanti di un substrato per volta.

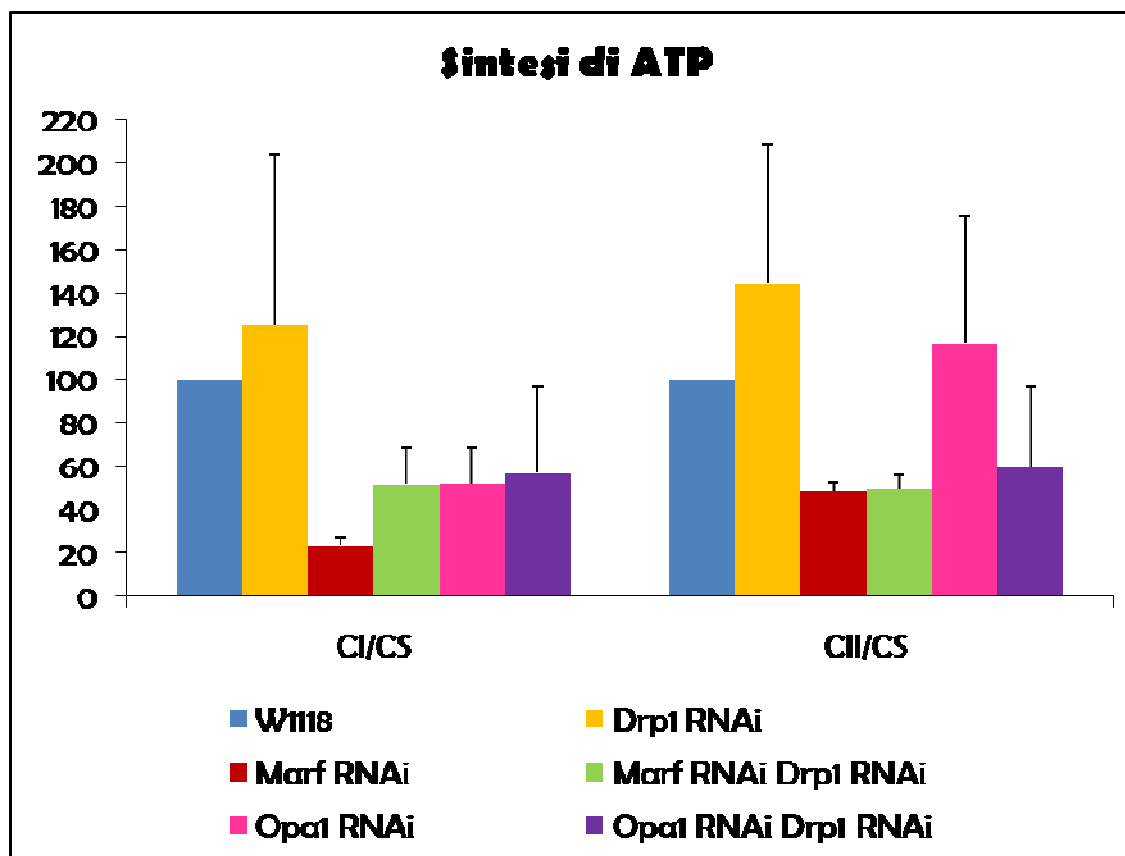


Fig. 39: Produzione di ATP mediata da complesso I e II. Nel grafico è riportata la velocità di sintesi di ATP tramite malato e piruvato (C1) e tramite succinato (CII). Si osserva una riduzione della produzione di ATP mediata da entrambi i complessi in tutti i genotipi analizzati ad eccezione della linea in cui Drp1 è ridotta. Le barre d'errore rappresentano \pm SEM.

Tutti gli esperimenti effettuati e le analisi svolte confermano l'importanza della morfologia mitocondriale per una omogenea distribuzione dei mitocondri lungo l'assone e in giunzione neuromuscolare. Inoltre la ridotta attività dei complessi e la diminuzione della velocità di sintesi di ATP in individui che mostrano mitocondri di morfologia normale conferma l'ipotesi che è sufficiente la morfologia mitocondriale per regolare la distribuzione, indipendentemente dalla funzionalità dei mitocondri.

DISCUSSIONE

Numerose patologie neurodegenerative presentano un'alterazione della distribuzione e del movimento dei mitocondri lungo l'assone spesso associata a difetti nei meccanismi di fusione e fissione mitocondriale. Studi hanno messo in evidenza, in patologie come le neuropatie di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2 (CMT2), una ridotta mobilità mitocondriale negli assoni di colture di neuroni sensoriali (Baloh, 2007) e un'alterata distribuzione dei mitocondri in motoneuroni di topi transgenici (Detmer, 2008). La CMT2 è una patologia neurodegenerativa che interessa i nervi periferici caratterizzata da degenerazione delle fibre nervose. Nel 2004 Zuchner e colleghi hanno individuato nel gene Mitofusina 2 (Mfn2) mutazioni *missense* a livello del dominio GTPasico responsabili dello sviluppo della neuropatia.

Il meccanismo molecolare attraverso il quale mutazioni nel gene Mfn2 causano la degenerazione delle fibre nervose non è chiaro. Tuttavia un'ipotesi che è stata avanzata sulla base di evidenze sperimentali ottenute in modelli cellulari è che una diminuzione del trasporto mitocondriale lungo l'assone causato da mutazione di Mfn2 riduca il numero di mitocondri che giungono all'assone distale, inclusa la sinapsi. I mitocondri infatti sono organelli deputati alla produzione di energia che a livello sinaptico è necessaria per la trasmissione degli impulsi elettrici. Questa perdita di energia nella sinapsi potrebbe alterarne la funzionalità causando la progressiva degenerazione assonale osservata nella malattia.

Un'altra ipotesi proposta (Misko, 2010) è che mitofusina sia direttamente coinvolta nel processo di trasporto mitocondriale. L'espressione di mitofusina mutata causa la diminuzione della velocità di movimento dei mitocondri in entrambe le direzioni e aumento del numero di mitocondri stazionari. Inoltre, la down-regolazione di Opa1 non provoca difetti del trafficking mitocondriale e quindi il trasporto mitocondriale è regolato in modo specifico da Mitofusina.

Sulla base di queste ipotesi, abbiamo utilizzato la *Drosophila* come modello per cercare di capire l'importanza della morfologia e della funzionalità mitocondriale nella distribuzione intracellulare dei mitocondri nei neuroni al fine di comprendere il ruolo di Marf e Opa1 nel trafficking mitocondriale assonale.

Sono stati analizzati network mitocondriale nei corpi cellulari dei neuroni, la morfologia dei mitocondri negli assoni, la distribuzione intracellulare in assoni lunghi e corti e il popolamento mitocondriale in giunzione neuromuscolare in individui cui vi è riduzione tessuto specifica nel sistema nervoso di Drp1, Marf e Opa1. La morfologia e il network

mitocondriale in individui Marf RNAi e Opa1 RNAi: nel soma si osservano aggregati di mitocondri e la perdita del reticolo mitocondriale mentre negli assoni i mitocondri appaiono frammentati, indice di difetti nel processo di fusione mitocondriale. Inoltre è stata osservata una diversa distribuzione dei mitocondri lungo gli assoni lunghi con diminuzione della percentuale di mitocondri nelle regioni distali del nervo rispetto a quelle prossimali e conseguente deplezione di mitocondri in giunzione neuromuscolare. La riduzione di espressione di Marf e Drp1 causa un parziale recupero del fenotipo di Marf: si osservano aggregati mitocondriali di dimensioni più piccole nel soma e negli assoni i mitocondri sono di dimensioni maggiori. Inoltre la distribuzione mitocondriale lungo l'assone è parzialmente recuperata come anche la percentuale di mitocondri presente nelle NMJs. Sorprendentemente invece, individui in cui è ridotta l'espressione di Opa1 e Drp1 simultaneamente mostrano network mitocondriale pressoché normale nei corpi cellulari e non si osserva la formazione di aggregati. Inoltre negli assoni la maggior parte mitocondri sono di dimensioni simili ai controlli e la distribuzione mitocondriale negli assoni e il popolamento in giunzione è simile ai controlli. I dati supportano l'ipotesi che la riduzione d'espressione simultanea di proteine coinvolte in processi mitocondriale opposti sia sufficiente a controbilanciare i difetti causati da Marf RNAi e Opa1 RNAi e suggeriscono che l'alterazione della distribuzione mitocondriale assonale dipenda dalla morfologia mitocondriale: solo i mitocondri che presentano una morfologia adeguata riescono a muoversi lungo l'assone, distribuirsi in modo omogeneo e percorrere lunghe distanze, raggiungendo le regioni distali nel nervo.

La mancanza contemporanea di mitocondri in giunzione e la formazione gli aggregati nel soma osservata in Marf RNAi e Opa1 RNAi potrebbe essere dovuta ad un blocco del trasporto mitocondriale anterogrado, con accumulo di mitocondri nel corpo cellulare o ad un aumentato trasporto retrogrado. La riduzione della percentuale dei mitocondri in movimento e la riduzione del numero assoluto di mitocondri anterogradi e retrogradi che si osserva inseguito a down-regolazione sia di Marf sia di Opa1 indica che, al contrario di quanto proposto (Misko, 2010), l'effetto sul movimento dei mitocondri non è specifico per la mitofusina (Marf in *Drosophila*) e suggerisce quindi che né Marf né Opa1 sono coinvolte direttamente nel trasporto mitocondriale. A conferma di questo, è stata analizzata la capacità Marf e Miro di formare complessi proteici responsabili del trasporto anterogrado dei mitocondri: Marf e Miro infatti non interagiscono tra loro in modo diretto. Questo conferma che l'alterazione del traffico mitocondriale assonale è indipendente da mitofusina e avvalorata l'ipotesi che l'alterazione della distribuzione dei mitocondri negli assoni lunghi non sia dovuta a

difetti del meccanismo di trasporto ma dipenda dalla morfologia e dalla dimensione del mitocondrio.

Alterazioni della morfologia mitocondriale sono state frequentemente associate a deficit energetici e malfunzionamento dei mitocondri (Chen, 2005). La produzione di energia è necessaria soprattutto in cellule come i neuroni che la utilizzano per il trasporto dei mitocondri in assone, giunzione e dendriti. Generalmente si assume che mitocondri con morfologia normale producano ATP e siano in grado di muoversi lungo l'assone. I dati qui riportati suggeriscono invece che non è così. Infatti, l'espressione neuronale simultanea di Opa1 RNAi e Drp1 RNAi induce un recupero pressoché completo di morfologia e distribuzione mitocondriale. Tuttavia questi individui depleti parzialmente di Opa1 e Drp1 mostrano un consumo di O₂ fortemente ridotto e muoiono al terzo stadio larvale. Al contrario, la riduzione simultanea dell'espressione di Marf e Drp1, in cui i mitocondri rimangono sostanzialmente frammentati, causa un aumento del consumo di ossigeno e un recupero del fenotipo di letalità di Marf RNAi. Questo implica che la distribuzione dei mitocondri dipende dalla morfologia e che entrambe possono essere slegate dalla funzione. Per esaminare questa ipotesi sono state valutate la capacità respiratoria mitocondriale in condizioni fisiologiche, l'attività enzimatica dei complessi della catena respiratoria e la velocità di produzione di ATP. La riduzione dell'espressione di Marf e Opa1 causa una riduzione della capacità di consumare ossigeno da parte dei mitocondri, una ridotta attività del complesso I e di conseguenza una ridotta produzione di ATP mediata da complesso I. Risultati paragonabili si ottengono anche in individui Opa1 RNAi ; Drp1 RNAi. La riduzione di Marf e Drp1 invece altera solo in parte la funzionalità mitocondriale: i dati di respirazione infatti mostrano capacità di consumo dell'ossigeno simili ai controlli anche se si osserva una ridotta attività enzimatica del complesso I. E' possibile che la riduzione dell'attività dei complessi non sia sufficientemente bassa da provocare alterazioni nella respirazione mitocondriale o subentrino meccanismi di compensazione.

In conclusione, la down regolazione simultanea di Opa1 e Drp1 produce mitocondri di dimensioni normali che vengono trasportati lungo l'assone e popolano la giunzione neuromuscolare nonostante la loro limitata funzionalità che risulta in letalità larvale. Al contrario, individui in cui Marf e Drp1 sono down-regolati presentano mitocondri morfologicamente anomali, la cui distribuzione è alterata, con un numero di mitocondri in giunzione molto inferiore a quello dei controlli. Tuttavia, questi mitocondri mostrano un recupero di funzionalità che permette all'individuo di svilupparsi e sopravvivere. Nell'insieme quindi i risultati ottenuti indicano che la morfologia mitocondriale è

importante per un'omogenea distribuzione lungo l'assone dei mitocondri e il loro trasporto alle sinapsi e che tali meccanismi sono indipendenti dalla funzionalità mitocondriale.

BIBLIOGRAFIA

[a] www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_Ch02/fig2_29.jpg

[b] Enciclopedia Britannica 1998

[c] www.towardsoneworld.eu

[d] www.origin-of-mitochondria.net

Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* (2000) 26:211–215.

Alirol E, James D, Huber D, Marchetto A, Vergani L, Martinou JC, Scorrano L. The mitochondrial fission protein hFis1 requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis. *Mol Bio Cell* (2006) 17:4593–4605.

Ammiot EA, Lott P, Soto J, Kang PB, McCaffery JM, DiMauro S, Abel ED, Flanigan KM, Lawson VH, Show JM. Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2. *Exp Neurol* (2008) 211:115–127.

Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, Langer T. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol* (2014) 6:919–929.

Arnoult D. mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* (2007) 17:6–12.

Atwood H, Govind CK, Wu C-F. Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* (1993) 24:1008–1024.

Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wollberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, Zorzano A. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* (2005) 54:2685–2693.

Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* (2007) 27:422–430.

Barinaga M. Mutant fruit flies respond to Lorenzo's oil. *Science* (1999) 284:1899–1901.

Belenguer P, Pellegrini L. The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria? *Biochem Biophys Acta* (2013) 1833:176–183.

Bereiter-Hahn J, Vöth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* (1994) 27(3):198–219.

Bernard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Ltellier T, Rossignol R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* (2007) 291:1172–1182.

Bianchi C, Genova ML, Parenti Castelli G, Lenaz G. The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* (2004) 279(35):36562–36569.

Bossy B, Petrilli A, Klinglmayr E, Chen J, Lutz-Meindl U, Knott AB, Masliah E, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. S-Nitrosylation of DRP1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *JAD* (2010) 20 Suppl 2:513-526.

Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* (1993) 118(2):401-415.

Burte F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* (2015) 11:11-24.

Cai Q, Gerwin C, Sheng Z-H. Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria in axon of hippocampal neurons. *J Cell Biol* (2005) 170:959-969.

Carelli V, Musumeci O, Caporali L, Zanna C, La Morgia C, Del Dotto V, Porcelli AM, Rugolo M, Valentino ML, Iommarini L, *et al.* Syndromic parkinsonism and dementia associated with OPA1 missense mutations. *An Neurol* (2015) 78:21-38.

Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingerman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR, *et al.* Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell* (2008) 14:193-204.

Chan SL, Liu D, Kyriazis GA, Bagsiyao P, Ouyang X, Mattson MP. Mitochondrial uncoupling protein-4 regulates calcium homeostasis and sensitivity to store depletion-induced apoptosis in neural cells. *J Biol Chem* (2006) 281:37391-37403.

Chance B, Williams GR. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* (1955) 175(4469):1120-1121.

Chapman AL, Bennett EJ, Ramesh TM, De Vos KJ, Grierson AJ. Axonal transport defects in a Mitofusin 2 loss of function model of Charcot-Marie-Tooth disease in Zebrafish. *PLoS one* (2013) 8:e67276.

Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* (2005) 280:26185-26192.

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, and Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* (2003) 160:189-200.

Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* (2007) 130:548-562.

Chen KH, Guo X, Ma D, Guo Y, Li Q, Yang D, Li P, Qiu X, Wen S, Xiao RP, Tang J. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol* (2004) 6:872-883.

Chen S, Owens GC, Edelman DB. Dopamine inhibits mitochondrial motility in hippocampal neurons. *PLoS one* (2008) 3:e2804.

Chen Y, Sheng Z-H. Kinesin-1-syntrophin coupling mediates activity dependent regulation of axonal mitochondrial transport. *J Cell Biol* (2013) 202:351-364.

Chen Y-M, Gerwin C, Sheng z-M. Dynein light chain LC8 regulates syntrophin-mediated mitochondrial docking in axons. *J Neurosci* (2009) 29:9429-9438.

Civiletto G, Varanita T, Cerruti R, Gorletta T, Barbaro S, Marchet S, Lamperti C, Viscomi C, Scorrano L, Zeviani M. Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. *Cell Met* (2015) 21:845-854.

- Courchet J, Lewis TL, Lee S, Couchet V, Liou D-Y, Aizawa S, Polleux F. Terminal axon branching is regulated by the LKB1-NUAK1 kinase pathway via presynaptic mitochondrial capture. *Cell* (2013) 153:1510-1525.
- Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic Amp-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* (2007) 8:939-944.
- Dagda RK, Merrill RA, Cribbs JT, Chen Y, Hell JW, Usachev YM, Strack S. The spinocerebellar ataxia 12 gene product and protein phosphatase 2A regulatory subunit Bbeta2 antagonizes neuronal survival by promoting mitochondrial fission. *J Biol Chem* (2008) 283:36241-36248.
- Danino D, Hinshaw JE. Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol* (2001) 13:454-460.
- De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* (2008) 456:605-610.
- Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* (2001) 109:584-591.
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* (2000) 26:207-210.
- Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:14503-14508.
- Detmer SA, Chan DC. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protect mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* (2007) 176:405-414.
- Detmer SA, Vande Velde C, Cleveland DW, Chan DC. Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. *Hum Mol Genet* (2008) 17:367-375.
- Ehse S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou J-C, Westermann B, Rugarli EI, Langer T. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzyme and OMA1. *J Cell Biol* (2009) 187:1023-1036.
- Ferré M, Amati-Bonneau P, Toueman Y, Malthièry Y, Peynier P. eOPA1: an online database for OPA1 mutation. *Hum Mutat* (2005) 25:423-428.
- Ferre M, Caignard A, Milea D, Leruez S, Cassereau J, Chevrollier A, Amati-Bonneau P, Verny C, Bonneau D, Procaccio V, *et al.* Improved locus-specific database for OPA1 mutations allows inclusion of advanced clinical data. *Hum Mut* (2015) 36:20-25.
- Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 112:2174-2181.
- Franker MAM, Hoogenraad CC. Microtubule-based transport—basic mechanism, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *J Cell Sci* (2013) 126:2319-2329.
- Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *TIBS* (2000) 25:319-324.

- Frezza C, Cipolat S, Martins DB, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. OPA1 Controls apoptotic cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell* (2006) 126:177-189.
- Gandre-Babbe S, van der Blik AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* (2008) 19:2402-2412.
- Glater EE, Megaeth LJ, Stowers RS, Schwarz TL. Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* (2006) 173:545-557.
- Griffin EE, Chan DC. Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* (2006) 281:16599-16606.
- Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, van der Blik AM. Loss of intramembrane space protein Mgm1/Opa1 induce swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* (2004) 279:18792-18798.
- Grohm J, Kim SW, Mamrak U, Tobaben S, Cassidy-Stone A, Nunnari J, Plesnila N, Culmsee C. Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death Diff* (2012) 19:1446-1458.
- Guo X, Macleod GT, Wellington A, Hu F, Panchumarthi S, Schoenfield M, Marin L, Charlton MP, Atwood HL, Zinsmaier KE. The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron* (2005) 47:379-393.
- Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. The random collision model and critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* (1986) 18(5):331-368.
- Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* (1966) 30(2):269-297.
- Haghnia M, Cavalli V, Shah SB, Schimmelpfeng K, Brush R, Yang G, Herrera C, Pilling A, Goldstein LSB. Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for dynamin membrane attachment. *Mol Biol Cell* (2007) 18:2081-2089.
- Hales KG, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* (1997) 90:121-129.
- Hall ZW, Sanes JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Neuron* (1993) 10:99-121.
- Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, Show JM. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143: 359-373.
- Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2000) 16:483-519.
- Hinshaw JE. Dynamin spirals. *Curr Opin Struct Biol* (1999) 9:260-267.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanism and roles in brain function, development and disease. *Neuron* (2010) 68:610-638.
- Hoang B, Chiba A. Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Development Bio* (2001) 229:55-70.

- Hoang B, Chiba A. Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Development Bio* (2001) 229:55–70.
- Hollenbeck PJ. The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci* (1996) 1:d91-d102.
- Hoolenbeck PJ, Saxton WM. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* (2005) 118:5411–5419.
- Huber N, Guimaraes S, Schrader M, Suter U, Niemann A. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant of GADP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO Rep* (2013) 14:545–552.
- Hurd DD, Saxton WM. Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. *Genetics* (1996) 144:1075–1085.
- Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* (2005) 170:1021–1027.
- Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* (2004) 117:6535–6546.
- Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of Opa1. *EMBO J* (2006) 25:2966–2977.
- Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto Y, *et al.* Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* (2009) 11:958–966.
- Ishihara T, Ban-Ishihara R, Maeda M, Matsunaga Y, Ichimura A, Kyogoku S, Aoki H, Katada S, Nakada K, Nomura M, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Mol Cell Biol* (2015) 35:211–223.
- Jahani-Asl A, Pilon-Larose K, Xu W, Mc-Laurin JG, Park DS, McBride HM, *et al.* The mitochondrial inner membrane GTPase, optic atrophy 1 (Opa1), restores mitochondrial morphology and promotes neuronal survival following excitotoxicity. *J Biol Chem* (2011) 286(6):4772–4782.
- Jahn R, Scheller RH. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006) 7:631–643.
- James DI, Perone PA, Mattemberg Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* (2003) 278:36373–36379.
- Jensen RE, Hobbs AE, Cervený KL, Sesaki H. Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc Res Tech* (2000) 51:573–583.
- Jia X, Gorczyca M, Budnik V. Ultrastructure of neuromuscular junctions in *Drosophila*: comparison of wild type and mutants with increased excitability. *J Neurobiol* (1993) 24:1025–1044.
- Jones BA, Fangman WL. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Gen Dev* (1992) 6:380–389.
- Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* (1995) 377(6548):438–441.

- Kageyuma Y, Zhang Z, Roda R, Fukaya M, Wakabayashi N, Kensler TW, Reddy PH, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial division ensures the survival of postmitotic neurons by suppressing oxidative damage. *J Cell Biol* (2012) 197:535-551.
- Kang J-S, Tian J-H, Pan P-Y, Zald P, Li C, Deng C, Sheng Z-H. Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and effects short-term facilitation. *Cell* (2008) 132:137-149.
- Karle KN, Möckel D, Reid E, Schöls L. Axonal transport deficit in a KIF5A^{-/-} mouse model. *Neurogenetics* (2012) 13:169-179.
- Kashatus DF, Lim KH, Brady DC, Pershing NL, Cox AD, Counter CM. RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission in mitosis. *Nature Biol* (2011) 13:1108-1115.
- Kawalec M, Zabłocza B, Kabzinska D, Naska J, Beresewicz M. Mitofusin 2 expression dominates over mitofusin 1 exclusively in mouse dorsal root ganglia - a possible explanation for peripheral nervous system involvement in Charcot-Marie-Tooth 2A. *Pol Ac Sci* (2014) 52 :436-442.
- Kerbowoski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* (2006) 443:658-662.
- Keshishian H, Broadie K, Chiba A, Bate M. The *Drosophila* neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development and function. *Annu Rev Neurosci* (1996) 19:545-575.
- Kieper N, Holmström KM, Ciceri D, Fiesel FC, Wolburg H, Ziviani E, *et al*. Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1. *Exp Cell Res* (2010) 316(7):1213-1224.
- Klosowiak JL, Focia PJ, Chakravarthy S, Landahl EC, Freymann DM, Rice SE. Structural coupling of the EF hand and C-terminal GTPase domains in the mitochondrial protein Miro. *EMBO Rep* (2013) 14:968-974.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Neurosci* (2008) 9:505-518.
- Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural bases of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* (2004) 305 :858-862.
- Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Bliek AM, C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* (1999) 4:815-826.
- Lai CH, Chou Cy, Ch'ang LY, Liu CS, Lin W. Identification of a novel human gene evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* (2000) 10:703-713.
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowoski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators fis1, drp1 and opa1 in apoptosis. *Mol Biol* (2004) 15:5001-5011.
- Lehninger AL, David LN. *Principi di biochimica di Lehninger* (2000).
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* (2004) 119:873-887.
- Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49 and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Cell Biol* (2013) 24(5):659-667.
- Low HH, Lowe J. A bacterial dynamin-like protein. *Nature* (2006) 444:766-769.

- Macaskill AF, Kittler JT. Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol* (2010) 20:102-112.
- Mao K, Wang K, Liu X, Klionsky DJ. The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degeneration by autophagy. *Dev Cell* (2013) 26:9-18.
- Marchbank NJ, Craig JE, Leek JP, Toohey M, Churchill AJ, Markham AF, Mackey DA, Toomes C, Inglehearn CF. Deletion of the OPA1 gene in a dominant optic atrophy family: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease. *J Med Genet* (2002) 39:e47.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* (2008) 60:748-766.
- Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* (2004) 305:1747-1752.
- Misko AL, Sasaki Y, Turk E, Milbrandt J, Baloh RH. Mitofusin 2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J neurosci* (2012) 32:4145-4155.
- Mourier A, Motori E, Brandt T, Lagouge M, Anatasov I, Galinier A, Rappl G, Brodesser S, Hultenby K, Dieterich C, *et al.* Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *J Cell Biol* (2015) 208:429-442.
- Mozdy AD, McCaffery JM, Show JM. Dnm1p GTPase- mediate mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* (2000) 151:367-380.
- Müller-Rischart AK, Pils A, Beaudette P, Patra M, Hadian K, Funke M, Peis R, Deinlein A, Schweimer C, Kuhn PH, *et al.* The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO. *Mol Cell* (2013) 49:908-921.
- Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu YT, Davidson GL, Rossor AM, Polke JM, Castlman V, Manji H, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *J Neurol Neurosur Psych* (2012) 83:706-710.
- Naylor K, Ingerman E, Okreglak V, Marino M, Hinshaw JE, Nunnari J. Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *J Biol Chem* (2006) 281:2177-2183.
- Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstain P, McBride H. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induce depolarization. *J Biol Chem* (2005) 280:25060-25070.
- Nguyen TT, Oh SS, Weaver D, Lawandowska A, Maxfield D, Schuler M-H, Smith NK, Macfarlane J, Saunders G, Palmer CA, Debattisti V, Koshiha T, Pulst S, Feldman EL, Hajnóczy G, Shaw JM. Loss of Miro1-directed mitochondrial movement results in a novel murine model for neuron disease. *Prot Natl Acad Sci USA* (2014) 111:e3631-3640.
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* (2005) 170:1067-1078.
- Niemann A, Wagner KM, Ruegg M, Suter U. GADP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* (2009) 36:509-520.

- Niemann HH, Knetsch ML, Scherer A, Manstein DJ, Kull FJ. Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms EMBO J (2001) 20:5813–5821.
- Noack R, Frede S, Albrecht P, Henke N, Pfeiffer A, Knoll K, Dehmel T, Meyer Zu Horste G, Stettner M, Kieseier BC, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GADP1 increase cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. Hum Mol Genet (2012) 21:150-162.
- Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G. OPA1 alternative splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. Cell Death Differ (2007) 14:682-692.
- Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. J Cell Biol (2010) 191(6):1141-1158.
- Otsuga D, Keegan BR, Brisch E, Thatcher JW, Hermann GJ, Bleazard W, Shaw JM. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. J Cell Biol (1998) 143:333-349.
- Palade GE. The fine structure of mitochondria. Anat Rec (1952) 114(3):427-451
- Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. EMBO Rep (2011) 12(6):565-573.
- Park SW, Kim KY, Lindsey JD, Dai Y, Heo H, Nguyen DH, Ellisman MH, Weinreb RN, Ju WK. A selective inhibitor of Drp1, mdivi-1, increases retinal ganglion cell survival in acute ischemic mouse retina. Inv Ophthalmol Vis Sci (2011) 52: 2837-2843.
- Parone PA, Da Cruz S, Tondera D, Mattenberger Y, James DI, Maechler P, Barja F, Martinou JC. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss mitochondrial DNA. PLoS one (2008) 3:e3257.
- Pedrola L, Espert A, Valdes-Sanchez T, Sanchez-Piris M, Sirkowski EE, Scherer SS, Farinas I, Palau F. Cell expression of GADP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. J Cell Biol Med (2008) 12:679-689.
- Pelloquin L, Benenguer P, Menon Y, Gas N, Ducommun B. Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin related protein. J Cell Sci (1999) 112:4151-4161.
- Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. J Struct Biol (1997) 119(3):260-272.
- Pesch UE, Leo-Kottler B, Mayer S, Jurklies B, Kellner U, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Alexander C, Wissinger. OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. Hum Mol Genet (2001) 10:4817-4826.
- Phelps CB, Brand AH. Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 system. Methods (1998) 14:367-379.
- Pilling AD, Horiuchi D, Lively CM, Saxton WM. Kinesin-1 and dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. Mol Biol Cell (2006) 17:2057-2068.

- Pla-Martin D, Rueda CB, Estela A, Sanchez-Piris M, Gonzales-Sanchez P, Traba J, de la Fuente S, Scorrano L, Renau-Piqueras J, Alvarez J, *et al*. Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GADP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurol Dis* (2013) 55:140-151.
- Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* (2004) 5:133-147.
- Quiros PM, Langer T, Lopez-Otin C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nature Rev Mol Biol Cell* (2015) 16:345-359.
- Rapaport D, Brunner M, Neupert W, Westermann B. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* (1998) 273:20150-20155.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribkov M, Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* (2001) 11:1114-1125.
- Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* (2002) 115:1663-1674.
- Rouzier C, Bannwarth S, Chausseot A, Chevrollier A, Verschueren A, Bonello-Palot N, Fragaki K, Cano A, Pouget J, Pellissier JF, *et al*. The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brian J Neurol* (2012) 135:23-34.
- Rowland KC, Irby NK, Spirau GA. Specialized synapse-associated structures within the calyx of Held. *J Neurosci* (2000) 20:9135-9144.
- Roy M, Reddy PH, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Opin Cell Biol* (2015) 33:111-118.
- Royan BJ, Hoek HJ, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci* (2015) 40:200-210.
- Russo GJ, Louie K, Wellington A, Macleod GT, Hu F, Panchumarthi S, Zinsmaier KE. *Drosophila* Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J Neurosci* (2009) 29:5443-5455.
- Sandoval H, Yao C-K, Chen K, Jaiswal M, Donti T, Lin YQ, Bayat V, Xiong B, Zhang K, David G, Charng W-L, Yamamoto S, Duraine L, Graham BH, Bellen HJ. Mitochondrial fusion but not fission regulates larval growth and synaptic development through steroid hormone production. *Elife* (2014) 14:3.
- Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* (2003) 116:2763-2774.
- Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* (2001) 114:867-874.
- Saporta MA, Dang V, Volfson D, Zou B, Xie XS, Adebola A, Liem RK, Shy M, Dimos JT. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease patient-derived motor neurons demonstrate disease-specific phenotypes including abnormal electrophysiological properties. *Exp Neurol* (2015) 263:190-199.

- Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y, Endo H. Differential sublocalization of the donami-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 300:482-493.
- Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* (2000) 19(8):1777-1783.
- Scorrano L. Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* (2009) 41:1875-1883.
- Sitarz KS, Yu-Wai-Man P, Pyle A, Stewart JD, Rautenstrauss B, Seeman P, Reilly MM, Horvath R, Chinnery PF. MFN2 mutations cause compensatory mitochondrial DNA proliferation. *Brain J Neurol* (2012) 135:e219,211-213; author reply e220,211-213.
- Sjostrand FS. A method to improve contrast in high resolution electron microscopy of ultrathin tissue sections. *Exp Cell Res* (1956) 10(3):657-664.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* (2001) 12:2245-2256.
- Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential and Yme1L. *J Cell Biol* (2007) 178:749-755.
- Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci* (2004) 117:1201-1210.
- Stowers RS, Megeath LJ, Gorska-Andrzejak J, Meinertzhagen IA, Schwarz TL. Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel drosophila protein. *Neuron* (2002) 36:1063-1077.
- Tang S, Le PK, Tse S, Wallance DC, Huang T. Heterozygous mutation of Opa1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increase reactive oxygen species production. *PloS one* (2009) 4:e4492.
- Twing G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* (2008) 27:433-446.
- Verstreken P, Ly CV, Venken JTK, Koh TW, Zhou Y, Bellen HJ. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at drosophila neuromuscular junctions. *Neuron* (2005) 47:365-378.
- Vettori A, Bergamin G, Moro E, Vazza G, Polo G, Tiso N, Argenton F, Mostacciolo ML. Developmental defects and neuromuscular alterations due to mitofusin 2 gene (MFN2) silencing in Zebrafish: a new model for Charcot-Marie-Tooth type 2 neuropathy. *NDM* (2011) 21:58-67.
- Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, Iijima M, Sesaki H. The dynamin-related protein GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* (2009) 186:805-816.
- Wang Y, Korman SH, Ye J, Gargus JJ, Gutman A, Taroni F, Garavaglia B, Longo N. Phenotype and genotype variation in primary carnitine deficiency. *Genet Med* (2001) 3(6):387-392.

- Wasiak S, Zunino R, McBride HM. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* (2007) 177:439–450.
- Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *UK J Med* (2007) 356:1736-1741.
- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2010) 11(12):872-884.
- Wilson TJ, Slupe AM, Strack S. Cell signaling and mitochondrial dynamics: implications for neuronal function and neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* (2013) 51:13-26.
- Yu-Way-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, Lourenco CM, Wright AF, Auer-Grumbach M, Toscano A, Musumeci O, Valentino ML, Caporali L, *et al.* Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain J Neurol* (2010) 133:771-786.
- Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Yuole RJ, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cossarizza A, Vidoni S, *et al.* OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain J Neu* (2008) 131:352-367.
- Zhao J, Liu T, Jin S, Wang X, Qu M, Uhlen P, Tomilin N, Shupliakov O, Lendahl U, Nister M. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J* (2011) 30:2762-2778.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battologlu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* (2004) 36:449-451.