



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: FISIOPATOLOGIA CLINICA E SCIENZE NEFROLOGICHE

CICLO XXVI

Ruolo dell'autofagia e della dinamica mitocondriale nella segregazione del DNA mitocondriale

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Aldo Baritussio

Supervisore : Dott.ssa Lodovica Vergani

Dottorando : Dott.ssa Sara Bettio

Gennaio 2014

*Dedico questa tesi alla mia famiglia
che muta negli anni
ma mantiene sempre la sua forza.*

INDICE

| | |
|---|-----|
| ABBREVIAZIONI..... | VII |
| ABSTRACT | 1 |
| RIASSUNTO..... | 3 |
| 1 INTRODUZIONE | 6 |
| 1.1 Mitochondri | 6 |
| 1.1.1 Struttura | 6 |
| 1.1.2 Catena respiratoria mitocondriale..... | 9 |
| 1.1.3 DNA mitondriale | 12 |
| 1.2 Eteroplasmia e segregazione dell' mtDNA | 13 |
| 1.3 Complementazione | 20 |
| 1.4 Malattie mitocondriali | 21 |
| 1.4.1 Geni nucleari nelle malattie mitocondriali | 21 |
| 1.4.2 Mutazioni del DNA mitocondriale..... | 22 |
| 1.4.2.1 Riarrangiamenti in larga-scala dell' mtDNA..... | 23 |
| 1.4.2.2 Mutazioni puntiformi dell' mtDNA | 24 |
| 1.4.2.2.1 Mutazioni puntiformi eteroplasmiche | 24 |
| 1.5 Cibridi..... | 28 |
| 1.6 Dinamica Mitocondriale | 29 |
| 1.6.1 Fissione mitocondriale..... | 30 |
| 1.6.2 Fusione mitocondriale | 31 |

| | |
|--|----|
| 1.6.2.1 Mitofusine | 32 |
| 1.7 Autofagia | 34 |
| 1.7.1 Passaggi che caratterizzano il processo autofagico: | 37 |
| 1.8 Mitofagia | 42 |
| 1.8.1 Premessa, nozioni generali | 42 |
| 1.8.2 Funzioni e caratteristiche di PINK1 nei mitocondri..... | 45 |
| 1.8.3 PINK1, funzioni coinvolte nello stato di salute mitocondriale | 48 |
| 1.1.4 Parkin promuove la poliubiquitinizzazione delle proteine mitocondriali | 50 |
| 1.8.5 Interazione di PINK1 e Parkin con il cuore del macchinario autofagico | 52 |
| 1.8.6 Mitofagia e dinamica mitocondriale..... | 54 |
| 1.8.7 Mitofagia durante i processi di differenziazione | 58 |
| 2 SCOPO | 61 |
| 3 MATERIALI E METODI | 64 |
| 3.1 Biologia cellulare | 64 |
| 3.1.1 Materiali per colture cellulari | 64 |
| 3.1.2 Linee cellulari..... | 64 |
| 3.1.3 Terreni | 65 |
| 3.1.3.1 Terreni per colture cellulari | 65 |
| 3.1.3.2 Dialisi del FCS | 67 |
| 3.1.4 Procedure di coltura..... | 68 |
| 3.1.4.1 Cellule proliferanti | 68 |
| 3.1.4.2 Cellule per valutazione dell'autofagia..... | 68 |

| | |
|--|----|
| 3.1.4.3 Flusso autofagico | 68 |
| 3.1.5 Conta cellulare | 69 |
| 3.1.6 Batteri | 69 |
| 3.1.6.1 Coltura batterica | 69 |
| 3.1.6.2 Trasformazione batterica tramite shock termico | 70 |
| 3.1.7 Transfezione | 70 |
| 3.2 Biologia molecolare..... | 73 |
| 3.2.1 Estrazione DNA da cellule | 73 |
| 3.2.2 Misura della concentrazione del DNA | 74 |
| 3.2.3 PCR..... | 74 |
| 3.2.3.1 PCR per polimorfismi nucleari..... | 76 |
| 3.2.3.2 Amplificazione del gene mitocondriale con PCR | 77 |
| 3.2.4 Digestione con Apa I..... | 77 |
| 3.2.5 Elettroferesi in gel d'agarosio..... | 78 |
| 3.2.6 Last Cycle Hot PCR (LC-PCR) and phosphor-imaging..... | 80 |
| 3.2.6.1 LC-PCR | 80 |
| 3.2.6.2 Gel d'acrilammide per elettroforesi..... | 82 |
| 3.2.6.3 Determinazione delle bande con phosphor-imaging | 83 |
| 3.2.7 Analisi molecolare delle cellule | 84 |
| 3.2.7.1 Polimorfismi nucleari | 84 |
| 3.2.7.2 Rilevazione e quantificazione della mutazione MELAS..... | 84 |
| 3.2.8 Estrazione RNA..... | 88 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 3.2.10 | Trascrizione inversa | 89 |
| 3.2.11 | qReal Time PCR..... | 90 |
| 3.2.11.1 | Procedura sperimentale | 90 |
| 3.2.11.2 | Analisi dei dati..... | 93 |
| 3.2.12 | Estrazione di proteine, SDS-Poliacrilamide gel elettroforesi (SDS-PAGE) e western blot..... | 94 |
| 3.2.13 | Estrazione di mitocondri da colture cellulari umane..... | 97 |
| 3.3 | Altre tecniche | 98 |
| 3.3.1 | Attività citrato sintasi | 98 |
| 3.3.2 | Fissaggio delle cellule su vetrino con paraformaldeide | 99 |
| 3.3.3 | Colorazione con MitoTracker [®] Red..... | 99 |
| 3.3.4 | Doppia colorazione: MitoTracker [®] Red e LC3..... | 100 |
| 3.4 | Analisi d'immagini..... | 100 |
| 3.5 | Analisi statistica..... | 101 |
| 4 | RISULTATI | 102 |
| 4.1 | Creazione e caratterizzazione di ibridi RD 80% eteroplasmici MELAS A3243G Down regolati per Mfn1 | 102 |
| 4.1.1 | Cibridi RD MELAS 80% mutati | 102 |
| 4.1.1.1 | Raccolta cloni | 102 |
| 4.1.1.2 | Real-Time PCR | 105 |
| 4.1.1.3 | Quantificazione dell' mtDNA mutato | 107 |
| 4.1.1.4 | Morfologia mitocondriale..... | 108 |

| | |
|--|-----|
| 4.2 Autofagia e mitofagia | 111 |
| 4.2.1 LC3 | 111 |
| 4.2.1.1 LC3 nel polmone | 112 |
| 4.2.1.2 LC3 nel muscolo..... | 113 |
| 4.2.2 p62 | 117 |
| 4.2.2.1 p62 nel polmone | 117 |
| 4.2.2.2 p62 nel muscolo..... | 118 |
| 4.2.3 PINK1 e PARKIN | 121 |
| 4.2.3.1 PINK1 nel polmone | 121 |
| 4.2.3.2 PINK1 nel muscolo | 123 |
| 4.2.3.3 Parkin nel polmone..... | 126 |
| 4.2.3.4 Parkin nel muscolo | 127 |
| 4.2.4 BNIP3 | 130 |
| 4.2.4.1 BNIP3 nel polmone | 130 |
| 4.2.4.2 BNIP3 nel muscolo..... | 131 |
| 4.3. AUTOFAGIA E MITOFAGIA CON IMAGING..... | 135 |
| 4.3.1 AUTOFAGIA..... | 140 |
| 4.3.1.1Autofagosomi polmone: | 140 |
| 4.3.1.2 Autofagosomi muscolo:..... | 141 |
| 4.3.1.3 Considerazioni autofagia polmone / muscolo | 142 |
| 4.3.2 MITOFAGIA..... | 144 |
| 4.3.2.1 Mitofagia polmone | 144 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.2.2 Mitofagia muscolo..... | 144 |
| 4.3.2.3 Considerazioni mitofagia polmone / muscolo..... | 145 |
| 5 DISCUSSIONE | 146 |
| 5.1 Influenza della dinamica mitocondriale sulla segregazione..... | 146 |
| 5.2 Caratterizzazione del potenziale autofagico e quantizzazione della mitofagia..... | 147 |
| 6 BIBLIOGRAFIA..... | 150 |

ABBREVIAZIONI

| | |
|----------|--|
| 32P-Dctp | Citidina 5'-[α -32P] trifosfato |
| AA | Aminoacidi |
| ANT | Adenina Nucleotide Translocatore |
| APS | Ammonio Persolfato |
| ATG | Autophagy related gene |
| BSA | Albumina di Siero Bovino |
| CLQ | Cloroquina |
| CoQ | Co-enzima Q |
| COX | Citocromo c ossidasi |
| CVT | Cytoplasm to vacuole targeting |
| DMEM | Dulbecco's Modified Edge Medium |
| DMSO | Dimetil Sulfossido |
| dNTP | Deossiribonucleotide trifosfato |
| DTNB | 5,5'-Dithiobis(2-acido nitobenzoico) |
| DTT | 1,4-dithio-DL-threitol |
| EDTA | Acido etilendiamminotetraacetico |
| ETC | Catena di Trasporto degli Elettroni |
| FADH2 | Falavina Adenina Dinucleotide Ridotta |
| FCS | Foetal Calf Serum (Siero fetale di vitello) |
| IMP | Isoleucina Metionina Fenilalanina |
| LAMP2A | Proteina associata alla membrana lisosomiale 2A |
| LC-PCR | Last Cycle Hot PCR |
| LHON | Leber Hereditary Optic Neuropathy |
| MELAS | Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, strokes-like episode |
| MERRF | Myoclonus Epilepsy Associated with Ragged - Red Fibers |
| MFN | Mitofusina |
| MIRO | Mitochondria Rho-GTPase |
| mtDNA | DNA mitocondriale |

| | |
|----------|--|
| MTR | Mito tracker red |
| NAC | N-Acetil-Cisteina |
| NADH | Nicotinammide Adenina Dinucleotide |
| NARP | Neuronal Ataxia Retinitis Pigmentosa |
| O.D. | Optical Density |
| OPA | Optic Atrophy |
| OXPPOS | Fosforilazione Ossidativa |
| PAS | Sito d'assemblaggio del fagoporo |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Reazione a Catena Polimerasica |
| PFA | Para-formaldeide |
| PI3K | Phosphatidil inositol 3- Kinase 1 |
| PINK | PTEN-induced putative protein kinase 1 |
| POD | Perossidasi |
| PS | Penicillina e Streptomicina |
| RD | Rabdomiosarcoma |
| RFLP-PCR | Restriction Fragment Length Polymorphism PCR |
| RT-PCR | Real Time PCR |
| SDS | Sodio Dodecil Solfato |
| SOD | Superossido dismutasi |
| TAE | Tris-Acetato-EDTA |
| TBE | Tris-Borato-EDTA |
| TE | Tris-EDTA buffer |
| TEMED | N,N,N',N'- Tetrametiletildiammina |
| TOR | Target della rapamicina |
| VIT | Vitamine |

ABSTRACT

Mitochondrial DNA is maternally inherited and its copy number can reach thousand per cell. Pathological mutations of human mtDNA have been known for many years and mutant mtDNA molecules frequently co-exist with wild-type copies of mtDNA. The most common point of mutation is adenine to guanine transition at nucleotide position (nt) 3243 of human mtDNA that is associated with the neuromuscular disease MELAS. How deleterious mtDNA mutations become established, and how they wax and wane over the course of the time are matters of intense investigation. Several reports have suggested that mutant mtDNA become fixed purely by the stochastic process of genetic drift. However, recent study in mouse suggest that a purification, selection process, operates in germline to weed out deleterious mtDNA variants. The distribution of A3243G mtDNA in patients with mitochondrial disease was found to be non-random in our study. Thus, there is ample evidence that mutant load is not merely determined by random genetic drift. The segregation and transmission of mtDNA is dependent on mitochondrial movement and elimination. Even in non-dividing cells mitochondria are dynamic undergoing fusion and fission; they range from small spherical structures to complex interconnected networks. The extent of the network depends on the balance between elongation and fragmentation of mitochondria. In our laboratory was demonstrated that altering the balance between mitochondrial fission and fusion influences the segregation of mutant and wild-type mtDNA variants, suggesting that the level of mutant and wild-type mitochondrial DNA can be manipulated by altering expression of nuclear encoded factors involved in mitochondrial fission and mitochondrial quality control (mtQC). The goals of the project are i) to clarify the relationship between mutant mtDNA segregation and mitochondrial dynamics with a manipulation of the mitochondrial fusion by Mitofusin1 gene silencing and ii) study the autophagic and

mitophagic machinery in cells with different proportion of MELAS mutant mtDNA : lung cybrids (0%, 35, 70%, 99% mutant) and muscle cybrids (0%,70%,80%,99%).

Since lung (A549 adenocarcinoma) cybrids favour wild-type mtDNA and muscle (RD rhabdomyosarcoma) cybrids favour mutant mtDNA. In this work we have obtained the downregulation of Mfn1 in six clones of RD cybrids harbouring 80% mutant load by using RNAi method. In these clones a decrease of mutant mtDNA molecules wasn't observed.

Autophagy was tested by quantifying expression e protein levels of the autophagic markers LC3 and p62.. We found that both the proteins were well represented in both the cells harbouring A3243G mutant mtDNA with different nuclear background , indicating a good autophagy in both cell lines with no differences linked to the nuclear background;. We analysed the sequestration, sorting and elimination of damage mitochondria by quantifying expression and protein level of the mitophagic markers PINK1, Parkin and BNIP3 at morphological, biochemical and molecular level.

All the data demonstrated that in lung cybrids the mitophagy increased with the increase of mutant load, indicating an active elimination of damaged mitochondria. Interesting in muscle cybrids occurred the opposite: the mitophagic process decreased with the increase of mutant load. These data clarify that in muscle background the mutant mtDNA is favored since mitophagy is altered. compare lung cybrids.

RIASSUNTO

Il DNA mitocondriale ha una trasmissione matrilineare ed ogni cellula contiene tra le 500 e le 10000 molecole di mtDNA.. Le mutazioni patologiche dell' mtDNA umano sono conosciute da numerosi anni ed è noto che le molecole di DNA mitocondriale mutato e wild-type coesistono all'interno della stessa cellula, condizione nota come eteroplasmia. La mutazione puntiforme più comune è la mutazione A3243G nel gene tRNA^{Leu(UUR)} del DNA mitocondriale umano ed è associata alla sindrome MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). In che modo le mutazioni dannose dell' mtDNA si stabilizzano, e come crescano e diminuiscano con il passare del tempo sono argomenti di grande interesse e che richiedono ancora notevole studio. Diversi articoli suggeriscono che il DNA mitocondriale mutato si fissa solamente attraverso un processo stocastico. Comunque studi recenti condotti su topo hanno dimostrato che a livello germinale vi è una purificazione, un processo selettivo, per eliminare le varianti dannose. Ed un altro studio un altro ha evidenziato che la distribuzione della mutazione A3243G nell' mtDNA di pazienti affetti da malattia mitocondriale non era casuale. C'è quindi una forte evidenza che la quantità di mutazione non è solamente determinata da un processo casuale di deriva genetica. La segregazione e la trasmissione dell' mtDNA sono dipendenti dai movimenti mitocondriali e dalla loro eliminazione. Anche in cellule che non si dividono i mitocondri sono organelli dinamici che sottostanno ad eventi di fissione e fusione; essi oscillano da una struttura piccola e sferica ad una complessa rete interconnessa. L'estensione di questa rete dipende dall'equilibrio tra elongazione e frammentazione dei mitocondri. Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che perturbando l'equilibrio tra la fissione e la fusione mitocondriale viene influenzata la segregazione dell' mtDNA wild-type e mutato, suggerendo che i livelli di DNA mitocondriale wild-type e mutato possono essere manipolati dall'alterazione dell'espressione di fattori nucleari codificanti per proteine coinvolte nella

fissione e nel controllo di qualità mitocondriale (mtQC). Lo studio ha avuto come obiettivi: i) chiarificare la relazione tra la segregazione dell' mtDNA mutato e la dinamica mitocondriale grazie alla manipolazione della fusione mitocondriale silenziando geneticamente Mitofusina1 e ii) studiare il macchinario autofagico e la mitofagia in cellule con una diversa percentuale di mutazione MELAS dell' mtDNA: ibridi di polmone (0%, 35%, 70% e 99% mutati) e ibridi di muscolo (0%, 70%, 80% e 99% mutati). Poiché i ibridi di polmone (A549 adenocarcinoma polmonare) favoriscono l' mtDNA wild-type e i ibridi di muscolo (RD rhabdomyosarcoma) favoriscono il DNA mitocondriale mutato.

In questo lavoro abbiamo ottenuto la down regolazione di Mfn1 in sei cloni di ibridi RD con l'80% di mutazione utilizzando la tecnica dell'RNAi. In questi cloni non è stato osservato un decremento delle molecole di mtDNA mutate. L'autofagia è stata analizzata quantificando l'espressione genica e la quantità di proteina dei principali markers quali: p62 e LC3. Abbiamo scoperto che entrambe le proteine sono presenti nelle due linee cellulari con mutazione A3243G dell' mtDNA e diverso background nucleare, indicando che vi è una buona "auto pulizia" in entrambe le linee cellulari e che non vi sono differenze legate al background nucleare. Abbiamo analizzato anche l'eliminazione specifica dei mitocondri danneggiati, mitofagia, quantificando l'espressione genica e i livelli di proteina di tre markers mitofagici: PINK1, Parkin e BNIP3. Inoltre sono state condotte analisi morfologiche, biochimiche e molecolari sempre per valutare sia l'autofagia che la mitofagia. Tutti i dati dimostrano che nei ibridi di polmone la mitofagia aumenta con l'aumentare del DNA mitocondriale mutato, indicando che vi è una attiva rimozione dei mitocondri danneggiati. Interessante è notare che nei ibridi muscolari si verifica l'opposto: la mitofagia diminuisce all'aumentare della percentuale di mutazione. Questi dati ci spiegano perchè nei ibridi con background muscolare viene favorito il DNA mitocondriale mutato, e mostrano come possibile causa di questo

comportamento la presenza di una mitofagia alterata e meno efficiente rispetto a quella dei ibridi con background polmonare.

1 INTRODUZIONE

1.1 Mitocondri

1.1.1 Struttura

I mitocondri permettono alla cellula di svolgere una miriade di servizi, come la produzione di energia, il tamponamento del calcio e la regolazione dell'apoptosi. Essi hanno inoltre un ruolo importante nel metabolismo dei lipidi, nucleotidi, folati, eme e dell' urea.

Molte cellule contengono centinaia di mitocondri. Come queste diverse funzioni siano coordinate tra le centinaia di mitocondri in una data cellula è largamente sconosciuto, ma dipende, probabilmente, dalla natura dinamica del mitocondrio.

La grandezza di questi organelli è all'interno di un range che va dai 0,5–1 μm . Un mitocondrio contiene sia una membrana interna che esterna composte entrambe da un doppio strato fosfolipidico e proteine. Proprio per questo tipo d'organizzazione con la doppia membrana ogni mitocondrio è diviso in cinque diversi compartimenti: la membrana mitocondriale esterna, lo spazio intermembrana (lo spazio tra membrana esterna ed interna), la membrana mitocondriale interna, lo spazio tra le creste (lo spazio formato dalle invaginature della membrana interna), e dalla matrice (lo spazio all'interno della membrana interna) (fig.1.1) [1-4].

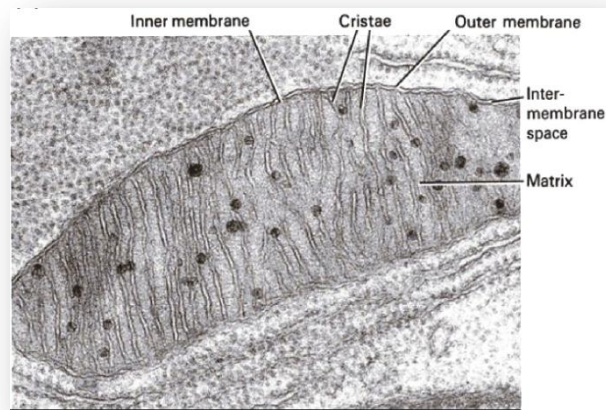


Figura 1: Immagine del mitocondrio con microscopia elettronica.

La membrana mitocondriale esterna, la quale include tutti quanti gli organelli, contiene numerose proteine chiamate porine. Le porine formano un largo canale acquoso che permette il passaggio di molecole di grandezza molecolare pari a 500 Dalton o meno. Anche proteine molto più grandi possono passare all'interno del mitocondrio attraverso una sequenza di segnali all'N-terminale la quale permette la traslocazione attraverso una proteina di diverse subunità nota come TOM (translocasi della membrana esterna). Lo spazio intermembrana è lo spazio compreso tra la membrana esterna e la membrana interna. Poichè la membrana esterna è liberamente permeabile alle piccole molecole ma non alle proteine, lo spazio intermembrana è chimicamente equivalente al citosol per quanto riguarda le piccole molecole, non rispetto alla composizione proteica. Tale spazio è la sede del citocromo C [5].

La membrana mitocondriale interna contiene centinaia di proteine coinvolte nella catena respiratoria, nella sintesi dell'ATP e nel trasporto specifico attraverso la membrana. La membrana mitocondriale interna è ricca di un inusuale fosfolipide, cardiolipina, che aiuta la membrana mitocondriale interna ad essere impermeabile; infatti la membrana mitocondriale interna non contiene porine ed è altamente impermeabile a tutte le molecole. Per lo più tutti gli ioni e le molecole necessitano di speciali trasportatori per

entrare ed uscire dalla matrice. Le proteine sono trasportate all'intero della matrice attraverso la translocasi del complesso della membrana interna (TIM). Inoltre vi è un potenziale tra la membrana interna formato dall'azione degli enzimi della catena di trasporto degli elettroni. La membrana mitocondriale interna è suddivisa in numerose creste che aumentano la superficie della membrana mitocondriale interna, aumentando la sua capacità di produrre ATP. Non sono semplici pieghe casuali ma invaginazioni della membrana interna che possono influire completamente sulla funzione chemioosmotica. I mitocondri delle cellule che hanno una domanda maggiore di ATP, ad esempio quelli del muscolo, contengono molte creste. Dalle immagini 3D ottenute dalla "tomografia microscopia elettronica" le creste appaiono polimorfe e tubulari. Le creste sono come borse gonfie con giunzioni strette tubulari alla membrana interna. La formazione delle creste e delle loro giunzioni è un processo dinamico che potrebbe esser controllato dal volume della matrice e dalla forze energetiche delle proteine lipidiche poste nei ripiegamenti della membrana. Ci sono evidenze che la membrana mitocondriale interna ha una struttura dinamica capace di cambiare forma rapidamente in risposta ad alterazioni delle condizioni osmotiche e metaboliche.

L'ipotesi è che questi cambiamenti conformazionali siano parte integrale di un meccanismo di risposta attraverso il quale il mitocondrio reagisce alle perturbazioni dell'ambiente esterno. Infatti nei mitocondri dei pazienti affetti da miopatia, è stato osservato che molte creste avevano perso la connessione con la membrana interna. La distruzione delle connessioni tubulari può spiegare l'attività alterata dei mitocondri patologici [6].

La matrice è lo spazio incluso dalla membrana mitocondriale interna. E' importante per la produzione dell'ATP con l'aiuto dell'ATP sintetasi contenuta nella membrana interna. La matrice contiene centinaia di enzimi che svolgono molte funzioni come l'ossidazione del piruvato, degli acidi grassi e il ciclo dell'acido citrico. Contiene anche i ribosomi

mitocondriali, il tRNA, e diverse copie del DNA mitocondriale. L'ipotesi endosimbiontica sull'origine dei mitocondri suggerisce che i mitocondri discendano da batteri specializzati (probabilmente batteri non-solfurei) che sono stati incorporati nel citoplasma di un'altra cellula mediante endocitosi. La capacità dei batteri simbiotici di svolgere la respirazione cellulare in cellule ospiti che dipendevano dalla glicolisi e fermentazione come fonte di energia ha arricchito questi ultimi con un considerevole vantaggio evolutivo. Questa relazione simbiotica probabilmente si è sviluppata 1.7-2 milioni di anni fa[7].

1.1.2 Catena respiratoria mitocondriale

La fosforilazione ossidativa (OXPHOS) avviene nella membrana mitocondriale interna grazie a quattro complessi enzimatici della catena respiratoria (complessi I-IV) e alla ATP sintetasi (complesso V).

Coenzima Q (un chinone) e il citocromo C sono solamente coinvolti nella catena respiratoria, servono come trasportatori di elettroni tra i complessi [1].

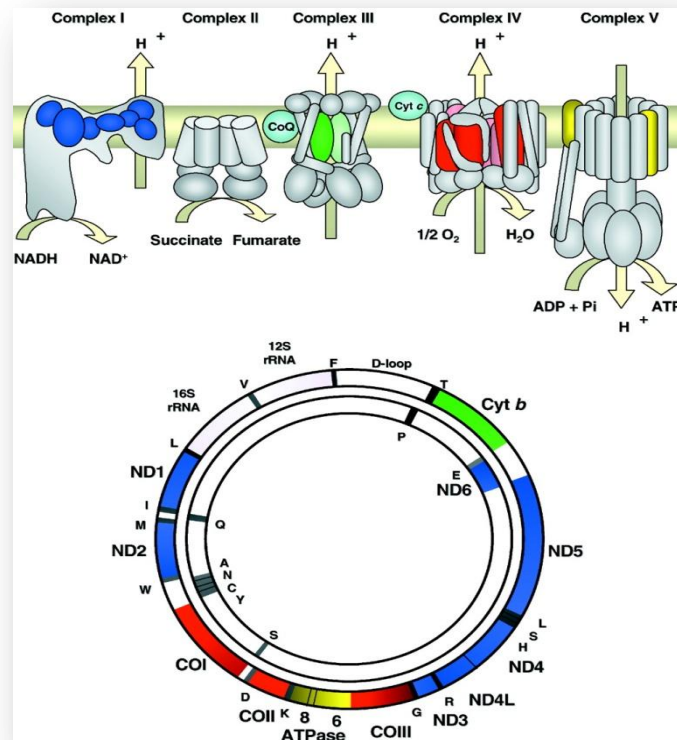


Figura 2: Creative drawing of the respiratory chain and human mitochondrial DNA

Negli umani, il complesso I o NADH-ubiquinone ossidoreduttasi, che compie l'ossidazione del NADH derivato dall'ossidazione degli acidi grassi, contiene sette subunità le quali sono codificate dall' mtDNA (subunità ND1-ND6 e ND4L), più al momento 39 subunità- nucleari codificate [8, 9].

Il complesso II o succinato-ubiquinone ossidoreduttasi, il quale compie l'ossidazione del FADH_2 derivato dagli acidi grassi e dal ciclo di Krebs, è composto da solo quattro subunità, tutte codificate dal genoma nucleare. Il complesso III o ubiquinol-ferrocitochene c ossidoreduttasi HOLDS ha una subunità, citocromo b, codificata dal genoma mitocondriale e 10 subunità codificate dal genoma nucleare. Il complesso IV o citocromo c ossidasi (COX) è composto da 13 subunità, tre delle quali codificate dall' mtDNA (COXI-III) e le altre 10 dal DNA nucleare. Inoltre la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni (mETC) altamente dinamica contiene, piccoli trasportatori di

elettroni, uno idrofobico, coenzima Q10 e la proteina citocromo c, sintetizzate da geni nucleari. In sostanza la mETC è costruita in modo speciale da poter accettare elettroni dal NADH e FADH₂ trasferendoli attraverso una serie di reazioni di ossido riduzione alla molecola di ossigeno per produrre acqua e per poter accoppiare contemporaneamente questa reazione esoergonica alla traslocazione di protoni attraverso la membrana interna [10, 11].

La sintesi di ATP dall'ADP è la seconda reazione fondamentale della catena respiratoria mitocondriale, un processo compiuto dal complesso V o ATP-sintetasi. ATP-sintetasi è composta da due subunità codificate dall' mt-DNA (ATPasi 6 e 8), e almeno da 14 subunità codificate dal DNA nucleare. Il gradiente protonico elettrochimico, generato a livello dalla mETC durante il trasferimento elettronico all'ossigeno, crea una polarizzazione della membrana interna. Il flusso protonico attraverso un canale protonico che risiede nella componente F₀ dell'ATPsintetasi, avviene in senso opposto. Il flusso di protoni guida la condensazione dell'ADP e un fosfato inorganico in ATP. Il trasferimento elettronico attraverso la mETC e la sintesi dell'ATP sono accoppiate, o unite. Infatti la catena respiratoria lavora come una pompa protonica che genera un gradiente protonico e un potenziale di membrana di circa 180mV attraverso la membrana interna con una polarità negativa nella parte della matrice della membrana interna. Il gradiente protonico è utilizzato dall'ATPsintetasi per fosforilare ADP nella matrice. Durante questo processo il gradiente protonico decresce e ciò attiva la respirazione. In particolare, la produzione di energia nei mitocondri richiede non solo un assemblaggio completo delle proteine funzionali a livello della membrana mitocondriale interna, ma anche un flusso bidimensionale di informazioni tra il genoma nucleare e il genoma mitocondriale per garantire la produzione di energia nei tessuti con diversa richiesta energetica [12].

In relazione a quanto detto, diverse mutazioni nell'mtDNA e nel DNA nucleare, codificando per le subunità, componenti o regolatori della funzionalità della catena respiratoria possono produrre un ampio range di malattie OXPHOS [13].

1.1.3 DNA mitocondriale

La prima descrizione della struttura circolare del DNA all'interno dei mitocondri risale a dati di 40 anni fa [14]. Una serie di caratteristiche peculiari discriminano il DNA mitocondriale da quello nucleare. I mitocondri sono poliploidi, infatti il DNA mitocondriale (mtDNA) è un genoma a più copie. Le cellule contengono centinaia di mitocondri, e ciascun mitocondrio contiene dalle cinque alle 10 copie di mtDNA. [15]. A seconda del tessuto e della richiesta energetica, ciascuna cellula contiene tra le 500 e le 10000 molecole di mtDNA, eccetto che per gli ovociti maturi che contengono tra 100000 e le 600000 molecole di mtDNA. Durante la divisione cellulare i mitocondri e il loro genoma vengono casualmente distribuiti alle cellule figlie. L'mtDNA umano è un minicromosoma circolare di 16569 bp, formato da due filamenti complementari, un filamento leggero ed uno pesante, con un codice genetico diverso dal DNA nucleare [16] ed è trasmesso interamente attraverso la linea materna.

L'mtDNA codifica per un totale di 37 geni. Sono 13 geni codificanti proteine chiave delle subunità dei complessi OXPHOS (complesso I, III, IV e V) e 22 RNAs transfer (tRNA) e 2 ribosomiali RNAs, geni coinvolti nella loro traslazione in situ. Approssimativamente il 6% dell'mtDNA è non-codificante, locato principalmente nel D-loop, una regione di 1kb, la quale non contiene introni, diversi geni che si sovrappongono e codoni dalle estremità incomplete [17]. Le molecole di mtDNA sono impacchettate nelle cellule somatiche come nucleoidi nei quali dalle sei alle dieci molecole formano un gruppo con diverse proteine differenti. Circa 30 proteine di specie diverse sono state identificate come potenziali componenti degli mt-nucleoidi. I nucleoidi sono attaccati alla

membrana mitocondriale interna vicino al sistema OXPHOS, dove le specie reattive dell'ossigeno (ROS) vengono prodotti. A causa della perdita di istoni e di altre proteine protettive e un inefficiente meccanismo di riparazione, gli mtDNA mutati sono 10-16 volte più frequenti che il DNA nucleare, e poichè non son presenti introni le mutazioni hanno una grande probabilità di colpire il gene e diventare patogenetico [18].

1.2 Eteroplasmia e segregazione dell' mtDNA

Diversamente dal DNA nucleare, del quale ci sono solo due copie di ciascun gene per cellula, centinaia di copie di mtDNA sono presenti in ciascuna cellula nucleata. Se comparato al DNA genomico nucleare, l'mtDNA accumula alterazioni ossidative in quantità molto maggiore grazie ai danni causati dalle specie reattive dell'ossigeno, che sono bioprodotti della fosforilazione ossidativa, e come conseguenza, mostrano un altissima quantità di mutazioni spontanee [19, 20]. Al contrario dell'eterogenità elevata che ci si aspettava dall'alto numero di copie e dalla quantità di mutazioni, come stato basale, tutte le copie di mtDNA sono geneticamente identiche all'interno della cellula e all'interno del più elevato individuo eucariote, inclusi gli umani. Questo stato genetico è chiamato "omoplasmia". Le mutazioni e generano l'eterogenità dell'mtDNA, che è chiamata "eteroplasmia" [21]. L'eteroplasmia si verifica all'interno della cellula (e probabilmente all'interno del mitocondrio stesso) e allo stesso modo all'interno e tra i tessuti, può così essere considerata una versione poliploide di ciò che nella genomica diploide è chiamata eterozigosi. L'eteroplasmia, ossia la presenza in un singolo individuo di mtDNA normale e mutato, si verifica in molte malattie mitocondriali, così la proporzione dell'mtDNA mutato in ciascuna cellula o tessuto può avere un range di valori dallo 0% al 100%. Di conseguenza si verifica un effetto soglia che determina l'espressione fenotipica del carattere associato alla mutazione dell'mtDNA. Infatti, per ciascuna mutazione eteroplasmica data, solamente quando si ha l'accumulo di copie

mutate del gene oltre un determinato valore soglia, gli effetti deleteri della mutazione non verranno più a lungo compensati dalle coesistenti copie di mtDNA wild-type, e sarà fenotipicamente espressa come disfunzione cellulare che provoca la malattia. L'accumulo progressivo dell'mtDNA mutato in un tessuto affetto è una spiegazione per la natura progressiva di queste malattie [22].

Una particolare caratteristica dell'mtDNA è la sua trasmissione matrilineare. Quando l'oocita è fertilizzato la stessa quantità dell'informazione genetica nucleare è data sia dall'oocita che dallo spermatozoo ma tutti i mitocondri e tutto il DNA mitocondriale derivano dall'oocita. Per tale ragione la trasmissione dell'mtDNA differisce dall'ereditarietà Mendeliana. Normalmente se una madre possiede una mutazione puntiforme, che può trasmettere a tutti i suoi figli ma solamente le sue figlie potranno poi trasmetterla alla loro progenie. L'eteroplasmia, quindi un valore soglia d'espressione e una segregazione stocastica sono caratteristiche della genetica matrilineare e non Mendeliana dell'mtDNA. Battersby et al. [23] utilizzarono un modello murino eteroplasmico per investigare le basi genetiche del comportamento della segregazione tessuto-specifica dell'mtDNA.

Diversamente dal DNA nucleare, la replicazione dell'mtDNA non è fortemente collegata al ciclo cellulare e non c'è un forte controllo della spartizione dell'mtDNA durante la citochinesi. Il livello di segregazione delle varianti nella sequenza dell'mtDNA è dovuto alla funzione del numero di copie dell'mtDNA e del livello di turnover, e in assenza di selezione, tale processo può esser rappresentato come un random walk. Ugualmente, molte delle mutazioni patogeniche dell'mtDNA sono eteroplasmiche, e la segregazione dell'mtDNA wild-type o mutato spesso deriva da questo pattern casuale, suggerendo che la disfunzione causata dalla mutazione influisce sul processo di segregazione. La stessa mutazione può inoltre produrre diversi fenotipi clinici in diversi pedigrees, come risultato di una distribuzione non-casuale dell'mtDNA mutato o wild-type, suggerendo che il

background nucleare può influenzare la segregazione dell' mtDNA [23]. Il pattern di segregazione delle mutazioni patogeniche dell' mtDNA è un fattore determinante della natura e della severità della malattia mitocondriale, ma essa varia a seconda della specifica mutazione, tipo di cellula e background nucleare. Yoneda et al. hanno osservato un vantaggio replicativo nella proporzione dei due genotipi mitocondriali in un numero di cloni ibridi, generati con un background nucleare di osso. In tutti i casi è stato osservato una shift con un incremento della proporzione dell' mtDNA mutato [24]. Una nuova scoperta di Dunbar et al., mostrò che il background genetico nucleare poteva influenzare la segregazione del genoma mitocondriale mutato e wild-type [25]. Infatti egli valutò se il fenomeno osservato da Yoneda et al. poteva esser riprodotto in un diverso background. Monitoraggio dell' mtDNA mutato (A3243G mutazione puntiforme nel gene mitocondriale tRNA^{Leu(UUR)}) sia in linee cellulari di polmone che di osso hanno mostrato un risultato diverso. I cloni ibridi polmonari eteroplasmici shiftano ad un alto livello di DNA mitocondriale wild-type rispetto al mutato mentre i ibridi di osso sempre shiftano verso un incremento di molecole di mtDNA mutato. Questi risultati indicano che il background nucleare genetico delle cellule recipienti (ρ^0) possono influenzare la segregazione del genoma mitocondriale wild-type o mutato nei ibridi cellulari.

Le mutazioni dell' mtDNA nell' uomo sono responsabili di diversi tipi di malattie mitocondriali, come le miopatie o malattie neurologiche. Gli individui femminili che portando una miscela di varianti dell' mtDNA normale o mutato trasmettono una quantità di mtDNA mutato alla progenie. La quantità di mtDNA mutato ereditato dalla madre determina lo sviluppo e la severità delle malattie. Diversi studi hanno suggerito che la trasmissione dell' mtDNA avvenga con un meccanismo noto come “collo di bottiglia” ma come esso si sviluppi rimane ancora poco chiaro. Questa teoria che spiega la trasmissione dell' mtDNA è stata la risposta ad una serie di osservazioni condotte nei mammiferi che mostravano un rapido cambiamento delle varianti dell' mtDNA attraverso

le generazioni. [26, 27] Studi recenti avevano proposto che il collo di bottiglia si verificasse durante la crescita embrionale come conseguenza di una drastica riduzione dell'mtDNA nelle cellule germinali primordiali (PGCs) mentre altri sostenevano che il collo di bottiglia avvenisse durante la maturazione degli oociti postnatale. [28, 29] Grazie ad uno studio approfondito e rigoroso condotto da Cao et al. 2009 [30] fu possibile chiarire questa diatriba provando con chiara evidenza che non c'è una riduzione del contenuto di mtDNA nelle cellule germinali primordiali. Questo dato ribadisce così il concetto che il collo di bottiglia avviene senza la riduzione dell'mtDNA nelle cellule germinali. [31] L'importanza di tale studio, oltre alla chiarificazione della precedente confusione, si basa sulla conoscenza del contenuto dell'mtDNA nella linea germinale facilitando così in futuro la crescita di strategie terapeutiche che potrebbero bloccare la trasmissione della malattia mitocondriale dalla madre alla progenie.

Come già detto la trasmissione dell'mtDNA negli animali avviene esclusivamente per via materna ed i meccanismi che eliminano la possibilità di una trasmissione paterna rimangono ancora sconosciuti. Lo studio condotto da Steve Z. DeLuca [32] però ha mostrato come i mitocondri nello sperma di *Drosophila* adulti perdessero l'mtDNA, evidenziando così una degradazione dell'mtDNA durante la spermatogenesi. [33] Tale risultato, che spiega perché la trasmissione dell'mtDNA paterno è ridotta, sembra essere valido anche per altre specie oltre *D.melanogaster*. Si ha ad esempio una diminuzione del numero di copie dell'mtDNA sia nella spermatogenesi umana che in quella murina e nel pesce medaka. Il suddetto lavoro prima evidenziò che il tempo di eliminazione dei nucleoidi era determinato dal reclutamento di actina nei coni di rivestimento perinucleari, concludendo che i nucleoidi mitocondriali erano eliminati in coordinazione all'elongazione dello sperma in *D. melanogaster*, e che in tale processo era coinvolta una nota nucleasi mitocondriale, EndoG, attiva nella prima eliminazione dell'mtDNA durante la spermatogenesi in *Drosophila melanogaster*. [34, 35] L'effettiva degradazione

dell'mtDNA durante la spermatogenesi in *D.melanogaster* elimina la possibilità del contributo dell'mtDNA paterno nell'ereditarietà mitocondriale. Di conseguenza uno sperma che trasmette il suo mtDNA potrebbe essere, per il futuro zigote, uno svantaggio, mentre uno sperma che ha eliminato il suo mtDNA potrebbe produrre uno zigote più soddisfacente. Il vantaggio conferito allo sperma senza mtDNA può rappresentare un meccanismo del sistema evolutivo che può aver funzionato ampiamente per promuovere l'evoluzione degli organismi nella spermatogenesi contribuendo a limitare i contributi paterni dell'mtDNA alla progenie.

La trasmissione materna dell'mtDNA rimane quindi una regola nella maggior parte degli animali e, come visto precedentemente, il mancato contributo dell'mtDNA paterno può rappresentare un vantaggio evolutivo ma le ragioni che controllano questo pattern rimangono sconosciute. Per investigare la conseguenza di una prioritaria trasmissione uniparentale, sono stati generati topi contenenti una miscela di mtDNA (eteroplasmia) NZB mtDNA e 129 mtDNA in presenza di un background nucleare C57BL/6J. [36] Le analisi svolte per valutare la segregazione dei due mtDNA attraverso le successive generazioni materne hanno rivelato che la proporzione di mtDNA NZB era preferenzialmente ridotta. Inoltre paragonando le tre linee mtDNA ottenute, quindi topi omoplasmici ZNB, omoplasmici 129, eteroplasmici NZB-129, questi ultimi mostravano una minor attività, minor capacità di procacciarsi il cibo, un' accentuata risposta allo stress e un'incapacità cognitiva. [37] Gli esperimenti condotti da Mark S. Sharpley [38] hanno infatti dimostrato che vi era un grande inclinazione che favoriva la progressione per l'omoplasmia dell'mtDNA 129S6 nella maggioranza degli animali con DNA nucleare C57BL/6J durante una o due generazioni. Contrariamente era necessario un tempo più prolungato per ottenere un topo omoplasmico NZB con lo stesso background nucleare. E' stato dimostrato inoltre che la variante 129 dell'mtDNA era selettivamente favorita nella progenie della madre. Fu osservata anche una stabilità dell'eteroplasmia nel

cervello, cuore, muscolo scheletrico e nella coda evidenziando così il contrasto della perdita dell'mtDNA 129 nel fegato e nei reni e la perdita dell'mtDNA ZNB nella milza e nel pancreas di topi adulti. [39] Si evidenziò che all'aumentare della proporzione di mtDNA ZNB materno vi era, nella progenie, una grande tendenza a perdere l'mtDNA NZB e che se la proporzione di mtDNA materno eccedeva il 60%-80% il livello di segregazione dell'mtDNA ZNB diminuiva. Quindi nei topi con approssimativamente un'uguale proporzione di mtDNA 129 e ZNB c'era un forte tendenza a diminuire l'mtDNA ZNB tra le generazioni. Comunque per le femmine con bassi livelli di eteroplasmia 129-ZNB la *predilezione* di ridurre l'mtDNA ZNB diminuiva. Infatti quando i livelli di ZNB o 129 dell'mtDNA diventavano del 10% o meno vi era una distribuzione degli mtDNAs casuale. [40] Nei topi venne studiato sia il ritmo circadiano che la capacità cognitiva; il ritmo circadiano è sotto il controllo combinato del sistema nervoso centrale, attraverso la risposta dei neuroni leggeri del nucleo soprachiasmico, e del ritmo circadiano di ciascuna cellula individuale all'interno del corpo. I topi eteroplasmici mostrarono una drammatica riduzione del numero di battiti dell'attività circadiana rispetto alla controparte omoplasmica 129 o ZNB; inoltre i topi eteroplasmici avevano una riduzione significativa anche dell'attività metabolica rispetto ai topi omoplasmici. Per quanto riguarda la capacità cognitiva i topi 129-ZNB mostrarono un'anormale ansietà e paura associata agli stati di stress rispetto ai topi omoplasmici. [41] In conclusione si poté dedurre che la miscela di due mtDNA della stessa specie, seppur "normali" all'interno di cellule mammifere e di linea germinale femminile, possono risultare geneticamente instabili provocando una segregazione non casuale dei diversi tipi di mtDNA durante l'invecchiamento dei tessuti e la trasmissione germinale. Infatti l'eteroplasmia mtDNA all'interno di un individuo può avere risultati fisiologici significativi, sia cognitivi che nel comportamento dando una spinta ad una trasmissione

uniparentale. Comunque il meccanismo fisiologico attraverso cui l'mtDNA "normale" può esser distinto dall'altro rimane sconosciuto.

Un sistema di "selezione" dell'mtDNA è pensabile anche come meccanismo di difesa contro delle alterazioni dell'mtDNA che devono essere eliminate nella linea germinale femminile. L'mtDNA infatti ha un grande tasso di mutazioni e le mutazioni puntiformi sono implicate in una vasta gamma di malattie degenerative ereditarie come le miopatie, cardiomiopatie e disordini neurologici e endocrini. Paradossalmente la frequenza delle malattie del DNA mitocondriale è alta, stimata 1 su 5000, ma solamente poche mutazioni dell'mtDNA spiegano la maggioranza dei casi famigliari. Ciò conferma la suddetta ipotesi: vi è una selezione per le più severe mutazioni dell'mtDNA che non seguono quindi una segregazione casuale. Uno studio condotto da Weiwei Fan [42] ha chiarito questo concetto di segregazione selettiva partendo dalla creazione di topi eteroplasmici contenenti mtDNA con due diverse mutazioni una più severa ND6, l'altra lieve CO1. [43] La mutazione ND6 è selettivamente eliminata durante l'oogenesi all'interno di 4 generazioni, mentre la forma più leggera mutazione CO1 è mantenuta attraverso multiple generazioni ed anche attraverso la progenie sviluppando miopatie mitocondriali e cardiomiopatie. [44] E' emerso infatti che la mutazione severa all'mtDNA ND6 veniva selettivamente eliminata dalla linea germinale femminile minimizzando così l'impatto nel fitness della popolazione. Quindi l'eteroplasmia potrebbe diluire i difetti associati alle più severe mutazioni dell'mtDNA supportando così il concetto che i più severi difetti dell'mtDNA vengono eliminati all'interno della linea germinale materna. La presenza di questo filtro contro le mutazioni deleterie dell'mtDNA ha un suo senso selettivo; è infatti ragionevole credere che sia importante eliminare certe mutazioni prima del concepimento. Perché questo tipo di filtro abbia successo divisioni cellulari multiple portano ad una enorme popolazione di proto-oocytes che potrebbero essere richiesti per l'eliminazione delle mutazioni dell'mtDNA mediante segregazione selettiva. Questo

potrebbe spiegare perchè le femmine mammifere generano milioni di oogoni primordiali ma ovulano solamente poche centinaia di oociti maturi. [42]

1.3 Complementazione

La scoperta di una varietà di mutazioni nell'mtDNA associate a malattie nell'uomo e la crescente evidenza dell'accumulo di mutazioni all' mtDNA nell'invecchiamento dei tessuti somatici ha aumentato il numero di domande circa la presenza e la frequenza di un mix interno di mtDNA wild-type o mutato e/o i loro prodotti all'interno della cellula e del ruolo della complementazione tra questi prodotti giocando un ruolo determinante nel fenotipo della cellula.

Studiando la complementazione dei genomi mitocondriali mutati e wild-type nelle cellule umane, Yoneda et al. [45] hanno osservato che una minoranza di mtDNA wild-type (4%) può proteggere la cellula contro gli effetti fenotipici del DNA mitocondriale mutato. Ugualmente, questi esperimenti non hanno chiarito come agiscano queste proteine: o la minoranza di mtDNA wild-type garantisce la sufficiente energia per i bisogni della cellula in uno stato completamente segregato dal DNA mitocondriale mutato o, alternativamente, c'è una cooperazione mescolando i prodotti del gene wild-type e mutato, durante la fusione mitocondriale, una condizione necessaria per esercitare l'effetto protettivo delle molecole wild-type. I risultati mostrano che l'interazione tra i genomi wild-type e mutato si verifica se i due genomi coesistono nello stesso organello. E' ragionevole pensare che nelle cellule in cui si ha questa eteroplasmia intramitocondriale essa sia mantenuta grazie ad un vantaggio selettivo dato dalla possibilità della complementazione che questa situazione permette. Mentre è stato osservato il fallimento dell'interazione in caso di eteroplasmia intermitocondriale [45] . E in vivo la complementazione inter-mitocondriale tra mitocondri COX⁻ con Δ mtDNA4696 e mitocondri COX⁺ con mtDNA wild-type fu proprio osservata da

Nakada et al. [46]. In vivo la complementazione inter-mitocondriale può prevenire in alcuni soggetti umani dall'espressione fenotipica dei difetti respiratori causati da varie mutazioni patogenetiche degli mtDNAs creati nei tessuti somatici con l'età. Questo risultato apre la possibilità alla terapia genica con l'introduzione di mitocondri aventi DNA con sequenza wild-type. Anche se procedure efficienti al momento non sono disponibili per l'introduzione di mitocondri o mtDNA in cellule di mammifero.

1.4 Malattie mitocondriali

I disordini mitocondriali hanno fenotipi clinici associati ad anomalie della fosforilazione ossidativa (OXPHOS), la componente finale del metabolismo energetico mitocondriale. Essi colpiscono almeno 1 su 5000 della popolazione generale, rendendole le più comuni malattie metaboliche ereditarie [19, 47].

La variabilità delle manifestazioni cliniche dell'mtDNA dipende da un numero di fattori, compresa la natura della mutazione, i.e. la sua patogenicità intrinseca, e il gene specificatamente affetto, la quantità di mutazione e la distribuzione nei tessuti, dipende da come ciascun organo gestisce l'approvvigionamento mitocondriale dell'energia. In generale, i sistemi visivo e uditivo, il CNS e PNS, il cuore, il muscolo, il pancreas endocrino, i reni e il fegato sono, in questo ordine, gli organi più sensibili al fallimento OXPHOS [8, 47, 48].

1.4.1 Geni nucleari nelle malattie mitocondriali

Con l'eccezione per il complesso II, il quale è interamente codificato dal DNA nucleare, i rimanenti complessi enzimatici OXPHOS sono composti da un numero variabile di subunità, codificate sia dal DNA nucleare che mitocondriale. Come risultato, i disordini OXPHOS possono essere determinati da mutazioni in ciascuno di questi genomi. Ugualmente il numero di geni OXPHOS-collegati, associati a sindromi mitocondriali, è

ancora piuttosto piccolo, la classificazione clinico-genetica può esser proposta per questi difetti, come segue [49]:

- geni codificanti componenti strutturali dei complessi OXPHOS
- geni codificanti fattori d'assemblaggio dei complessi OXPHOS
- geni che alterano la stabilità dell'mtDNA
- geni codificanti fattori coinvolti nella biogenesi dei mitocondri, compresi OXPHOS.
- geni di sintesi delle proteine mitocondriali
- geni codificanti enzimi biosintetici per grassi o cofattori [47].

I disordini OXPHOS associati alle mutazioni di geni nucleari stanno implementandosi ogni anno, indicando che questo campo riserverà novità importanti con la scoperta di nuove mutazioni.

1.4.2 Mutazioni del DNA mitocondriale

Le mutazioni dell'mtDNA comprendono sia riarrangiamenti in larga scala (i.e. delezioni parziali o duplicazioni), che sono generalmente sporadiche, e mutazioni ereditarie puntiformi, le quali sono al più trasmesse attraverso la linea materna. Mentre i riarrangiamenti in larga-scala sono esclusivamente eteroplasmici, le mutazioni puntiformi possono essere sia eteroplasmiche che omoplasmiche, e possono colpire geni strutturali o geni che codificano per l'apparato dell'RNA coinvolto nella traslazione dell' mtDNA [48, 49].

Le mutazioni puntiformi sono responsabili di un numero elevatissimo di fenotipi clinici differenti. Questa variabilità è stata associata alle peculiarità della genetica mitocondriale: segregazione casuale di una data mutazione all'interno del corpo umano; eteroplasmia e effetto soglia.

Sono stati identificati diversi meccanismi patogenetici a diversi livelli della funzione cellulare sono stati identificati. Infatti le mutazioni puntiformi possono: i) ridurre i livelli dello stato stazionario del corrispondente tRNA, ii) interferire con i livelli di aminoacetilazione con i corrispondenti aminoacidi, iii) indurre un pattern atipico di modificazione delle basi. Nel complesso le mutazioni puntiformi possono risultare in alterazioni quantitative o qualitative delle proteine della catena respiratoria (RC) [50].

1.4.2.1 Riarrangiamenti in larga-scala dell' mtDNA

I riarrangiamenti larga-scala dell' mtDNA possono essere singole delezioni parziali o parziali duplicazioni. I tre fenotipi clinici più frequenti associati a queste mutazioni sono: sindrome Kearns-Sayre (KSS), Oftalmoplegia sporadica esterna (PEO) e la sindrome di Pearson. KSS è un disordine sporadico che si sviluppa prima dei 20 anni d'età ed è caratterizzato da una triade di patologie: oftalmoplegia esterna cronica progressiva; retinite pigmentosa e cardiomiopatia. I pazienti con questa malattia invariabilmente mostrano Ragged Red Fiber RRFs nelle biopsie muscolari [51, 52]. Singole delezioni/duplicazioni possono anche risultare in fenotipi intermedi come la PEO, caratterizzata da oftalmoplegia esterna con tarda manifestazione progressiva, miopatia prossimale e intolleranza all'attività fisica. In entrambe KSS e PEO, frequenti manifestazioni addizionali sono diabete mellito e perdita dell'udito che possono precedere occasionalmente, lo sviluppo di sintomi neuromuscolari [53].

Le singole delezioni/ duplicazioni in larga-scala dell' mtDNA possono causare la sindrome di Pearson osso-midollo-pancreas, una malattia rara caratterizzata nella prima infanzia da pancitopenia sideroblastica congenita e, meno frequentemente, da una severa insufficienza pancreatica esocrina con malassorbimento. I neonati che sopravvivono fino all'età pediatrica o all'adolescenza possono sviluppare le manifestazioni cliniche della KSS [54].

La maggioranza dei riarrangiamenti singoli in larga scala dell' mtDNA sono sporadici e sono per questo considerati come il risultato di un' amplificazione clonale di un singolo evento mutazionale, che si verifica nell' oocita materno o precedentemente durante lo sviluppo dell' embrione [55].

1.4.2.2 Mutazioni puntiformi dell' mtDNA

Le mutazioni puntiformi all' mtDNA sono generalmente a ereditarietà matrilineare possono essere omoplasmiche o eteroplasmiche.. Riduzioni marcate da entrambe le proteine mitocondriali di sintesi e della respirazione sono state documentate per le mutazioni puntiformi, quando viene raggiunto il valore soglia dell' 80-90% di mtDNA mutato. E' importante menzionare che la variabilità clinica e biochimica di molte delle mutazioni all' mtDNA possono essere dovute da diversi backgrounds di geni mitocondriali o nucleari.

1.4.2.2.1 Mutazioni puntiformi eteroplasmiche

1.4.2.2.1.1 MELAS

L' acronimo MELAS sta per encefalomiopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi stroke-like fu per la prima volta coniato da Pavlakis et al.

MELAS è la più comune malattia mitocondriale, si sviluppa tra la giovinezza e l' età adulta. MELAS è caratterizzata: i) dalla presenza di episodi stroke-like dati dalle lesioni focali cerebrali spesso localizzate nei lobi della parete occipitale, ii) da acidosi lattica, iii) e/o da fibre muscolari rosse lacerate dette RRF. Si è visto il coinvolgimento multisistemico di vari organi apparati, compreso il sistema nervoso centrale (CNS). I muscoli scheletrici, occhi, muscolo cardiaco e più recentemente il sistema gastrointestinale e renale. Segni del coinvolgimento CNS sono la demenza, mal di testa ricorrenti e vomiti, attacchi focali o generalizzati, retinite pigmentosa, stanchezza e atassia può essere osservata in alcuni pazienti.

Il primo episodio di stroke generalmente si verifica in gioventù in un'età compresa tra i 4 e 15 anni, ma a volte può verificarsi in neonati e giovani adulti. Prima del primo stroke il bambino può mostrare un ritardo nella crescita e nello sviluppo. MELAS è stata associata ad una mutazione puntiforme eteroplasmica tRNA^{Leu(UUR)}, una mutazione A → G nella posizione 3243. Approssimativamente l'80% dei pazienti MELAS porta la mutazione A3243G. Molte altre mutazioni puntiformi MELAS-associate sono state riscontrate in seguito nei geni tRNA^{Phe}, tRNA^{Val}, tRNA^{Lys}, COXIII, ND1, ND5 o rRNA o delezioni in piccola scala dell' mt-DNA nel gene cytb. Nello stesso tRNA^{Leu(UUR)} sono state identificate altre mutazioni puntiformi (3244 G→A, 3258 T→C, 3271 T→C, and 3291 T→C) [56-62] associate alla sindrome MELAS.

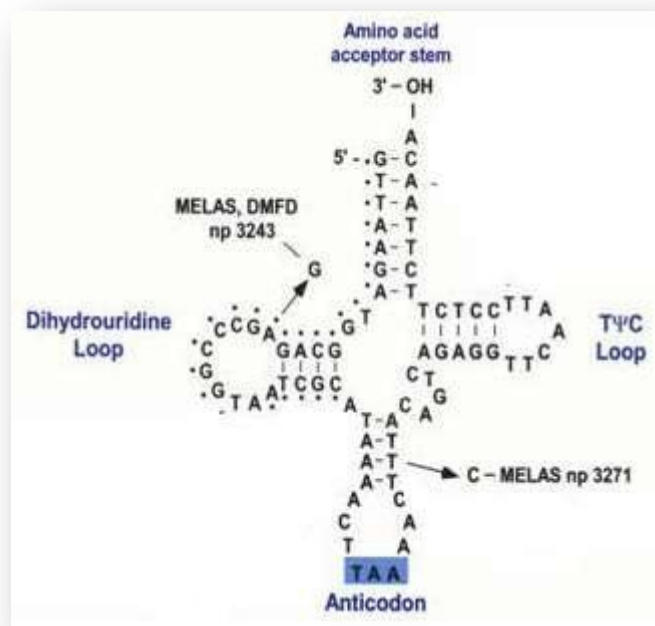


Figura 3: struttura secondaria del tRNA^{Leu(UUR)} mitocondriale umano. Le mutazioni A3243G e T3271C associate alla syndrome MELAS sono indicate dalle frecce.

La mutazione 3243A>G è stata determinata anche in diversi pazienti con PEO ad eredità materna, miopia isolata solitaria, cardiomiopatia, diabete mellito e sordità

matrialcalmente ereditate. [56,57] Disfunzioni mitocondriali come la MELAS possono avere molteplici cause, quali, la diminuzione della stabilità del tRNA, la diminuzione dell'amminoacetilazione, o conformazioni anormali, che potrebbero portare ad un decremento dei livelli dello stato-stazionario dei tRNA amminoacetilati risultando nella riduzione della sintesi di proteine mitocondriali. La riduzione dei livelli di leucina-tRNA^{Leu(UUR)} potrebbe non essere l'unico fattore che contribuisce alla diminuzione dei valori di sintesi delle proteine mitocondriali [63-66]. Infatti è stato osservato anche che le malattie associate alle mutazioni del gene mitocondriale tRNA sono correlate alla perdita delle modificazioni di base nei tRNA mutati. Nei cibridi di cellule omoplasmiche HeLa per la mutazione puntiforme patogenica, la uridina modificata con taurina (τm^5s^2U ; 5-taurinomethyluridine), che normalmente si trova nella posizione instabile dell'anticodone del tRNA^{Leu(UUR)} mitocondriale, rimane inmodificata nel mt tRNA^{Leu(UUR)} con le mutazioni MELAS sia la A3243G che T3271C. Ciò indica che l'enzima responsabile per il gruppo della 5-taurinomethyl che modifica l' RNA, enzima ancora non identificato, appartiene ad una classe di enzimi che riconosce l'intera struttura tridimensionale del tRNA, perchè np 3243 è lontana dalla posizione variabile. E' noto che la modificazione dell'uridina nella posizione variabile è responsabile del riconoscimento preciso ed efficiente del codone. Nella sindrome MELAS, la mutazione 3243A>G è stato dimostrato esser la causa diretta nella riduzione del consumo di ossigeno e della sintesi di proteine mitocondriali utilizzando un modello di cibridi cellulari nei quali la mutazione del DNA mitocondriale derivata da pazienti veniva inserita in cellule "recipienti" prive di mtDNA (cellule ρ^0). Nella sindrome MELAS, e in tutte le malattie mitocondriali, la segregazione e l'effetto soglia giocano un ruolo primario nella respirazione e nella funzione bioenergetica delle cellule. Utilizzando il modello cellulare di cibridi, è stato osservato che sotto al 70% di DNA mitocondriale mutato le cellule sono apparentemente normali. Tra il 70% e il 90% di mtDNA mutato si

evidenzia un difetto moderato (intermedio) del complesso I. oltre il 90% di DNA mitocondriale mutato vi è una generale riduzione della respirazione, con un basso rapporto ATP/ADP, un decremento della carica energetica e incremento dello stress ossidativo, ma solamente il 95% o più di mtDNA mutato provoca un severo calo nella sintesi delle proteine mitocondriali.[67,68]

Anche le misurazioni delle attività respiratorie degli enzimi in mitocondri intatti hanno rivelato che più della metà dei pazienti con sindrome MELAS possono avere un deficit al complesso I. Il tRNA^{Leu(UUR)}, mancando della modificazione della taurina, mostrava una translocazione UUG assai ridotta. Questi risultati possono spiegare la translocazione difettosa dei geni ricchi in UUG come ND6 (componenti del complesso I) che porta ad una diminuzione rilevabile dell'attività della catena respiratoria. Sfortunatamente non ci sono al momento trattamenti per fermare il danno causato dalla sindrome MELAS e non esiste al momento una cura efficace per la sindrome MELAS. Moderati training ciclici possono aiutare ad allungare la durata di vita degli individui con miopatia. Terapie metaboliche con somministrazione di: coenzima Q10, filochinone, ascorbato, riboflavina, nicotinammina, creatina monoidrata, succinato e dicloroacetato hanno portato benefici in alcuni casi. Questi trattamenti includono il. Se questi supplementi aiuteranno tutti gli individui con la sindrome MELAS è ancora da essere studiato.

1.5 Cibridi

Non ci sono procedure disponibili per creare modelli di malattia attraverso l'introduzione diretta di mtDNA mutato in cellule o in embrioni di topo. Le uniche porcedure che permettono di introdurre mtDNA esogeno sono microiniezione di mitocondri o tecniche di fusione cellulare. Gli ibridi citoplasmatici (cibridi) sono creati dalla fusione di cellule prive di nucleo (citoplasti) con cellule private dell'mtDNA (cellule ρ°) King ed Attari riuscirono ad eliminare l'mtDNA endogeno in linee cellulari umane. Questi autori per primi riportarono la creazione di linee cellulari di osteosarcoma umano ρ° chiamate 143B101 e 143B206. [69] Queste linee venivano create attraverso l'esposizione cronica delle cellule parentali all'etidio bromuro. L'esposizione all'etidio bromuro provoca un'auxotrofia pirimidinica, la quale può esser ripristinata aggiungendo al medium di coltura uridina. L'auxotrofia pirimidinica è probabilmente una conseguenza del fatto che l'attività dell'enzima diidrorotato deidrogenasi è in relazione all'attività della catena di trasporto degli elettroni. E' importante notare che malgrado queste cellule per molto tempo non contengono una quantità di mtDNA rilevabile, gli organelli mitocondriali tuttavia persistono. Inoltre entrambe le linee ρ° di osteosarcoma 143B si dimostrarono auxotrofe anche per il piruvato. [70] La spiegazione più accreditata per l'auxotrofia del piruvato mette in relazione l'assenza di mtDNA con la modulazione redox delle cellule anaerobiche. L'assenza della fosforilazione ossidativa priva le cellule del principale pathway d'ossidazione NADH. Quindi in teoria in una cellula che si basa dal punto di vista energetico solo sulla glicolisi potrebbe spiegarsi spostando il rapporto di NADH / NAD⁺ verso il NADH. Potrebbe essere promossa la rigenerazione di NAD⁺ attraverso la conversione del piruvato in lattato grazie alla lattato deidrogenasi. King ed Attardi inoltre dimostrarono la ripopolazione delle loro linee ρ° di osteosarcoma con mtDNA. Furono identificati due approci per ripopolare le cellule ρ° con DNA mitocondriale. Uno utilizzava la fusione PEG-mediata dei citoplasti enucleati con le cellule ρ° . L'altro

approccio coinvolgeva direttamente la microiniezione dei mitocondri isolati in cellule ρ° . L'uso delle piastrine al posto delle cellule denucleate è una variazione del del metodo di fusione PEG. [71] Questa modificazione si basa sul fatto che le piastrine non contengono nuclei ma contengono mitocondri e quindi mtDNA. Per questo sistema le piastrine sono essenzialmente trattate come citoplasti di preconfezionamento. Durante l'inizio del 1990, la tecnica di ibridi viene applicata allo studio delle encefalopatie mitocondriali; ad esempio sia nella sindrome MELAS che MERRF. I ibridi vennero utilizzati per comprendere l'effetto di tali mutazioni nella fosforilazione ossidativa e capire quale fosse il valore soglia e la quantità di mtDNA mutato necessario per provocare un fenotipo biochimico ormonale. Approci con l'uso dei ibridi sono risultati utili in studi di compatibilità tra DNA mitocondriale e DNA nucleare. [72] Nel nostro lavoro sono stati utilizzati ibridi eteroplasmici con DNA mitocondriale mutato A3243G MELAS ottenuti fondendo cellule ρ° di rhabdomyosarcoma (RD) con citoplasti derivati da ibridi di osteosarcoma (206). [73] Questi ibridi di osteosarcoma avvano il 74% della mutazione MELAS A3243G (206 MELAS 74%).

1.6 Dinamica Mitocondriale

Mentre nel passato i mitocondri erano descritti come organelli dalla forma a fagiolo fluttuanti nel citoplasma, ora si sa che i mitocondri hanno una morfologia complessa. I mitocondri continuamente cambiano la loro forma attraverso eventi combinati di fissione, fusione e muovendosi lungo microtubuli citoscheletrici. La grandezza dei mitocondri e il grado con cui essi formano un network sono determinate dall'equilibrio del grado di fissione e fusione. Questi livelli sono influenzati dalle condizioni metaboliche e patogenetiche dei mitocondri stessi e dal loro ambiente cellulare. Fusione e fissione sono importanti per la crescita, per la redistribuzione cellulare e per mantenere una rete di mitocondri sani. Inoltre, la fissione e fusione mitocondriale giocano un ruolo

predominante nei processi coinvolti nello sviluppo di malattie legate ad una alterazione dei processi di apoptosi e mitofagia. Drp1 è una GTPasi che interviene nella fissione della membrana mitocondriale e del perossisoma [74,75] Fis1 è localizzata nella membrana esterna ed è il recettore di Drp1. L'overespressione di Fis1 accelera la fissione, mentre il suo silenziamento inibisce la frammentazione mitocondriale [76,77]. Drp1 subisce modificazioni post-trascrizionali durante la fissione mitocondriale. La prima di queste modificazioni è la fosforilazione che favorisce la distribuzione di Drp1 nei mitocondri nelle nascenti cellule figlie. [78] Inoltre, Drp1 è substrato per reazioni con l'ossido nitrico, portando a S-nitrosilazione, o trasferimento di NO che regola la funzione proteica. [75] La fusione della membrana è un processo fondamentale per la vita delle cellule eucariotiche. Per esempio, le vescicole di trasporto si fondono con gli organelli del pathway secretorio, i gameti si fondono tra loro durante la fecondazione, e i virus entrano nelle cellule ospiti fondendo i loro rivestimenti con le membrane cellulari. La fusione mitocondriale è un processo ben coordinato in cui membrana esterna ed interna fondono in modo separato. I componenti principali di questo meccanismo sono le mitofusine (Mfn1/2) e Opa1. Mfn 1/2 sono localizzate nella membrana esterna del mitocondrio con sia il dominio C- che N-terminale localizzati nel citosol [79]. OPA1 è un altro componente chiave della fusione mitocondriale e del rimodellamento delle creste mitocondriali. Anche se gli eventi di fusione della membrana interna ed esterna sono separati, i loro meccanismi sono collegati. Per esempio, nei lieviti la proteina Ugo1 funziona come adattatore creando un complesso con Fzo1 (omologo di Mfn) e Mgm1 (omologo di OPA1) che attraversa le membrane [80,81].

1.6.1 Fissione mitocondriale

Nelle cellule di mammifero, la fissione mitocondriale, è regolata dalla proteina Dynamin-related protein 1 (Drp-1), una grande proteina ad attività GTPasica [82] la cui sequenza

amminoacidica presenta delle significative similitudini con quella delle dinamine. Le dinamine sono delle proteine ad attività GTPasica, che regolano il traffico vescicolare e l'endocitosi, tuttavia le funzioni molecolari delle dinamine e di Drp-1 non sono ancora molto chiare. Sulla base di studi di genetica, biologia cellulare e biochimica, sono stati proposti due modelli che spiegherebbero il meccanismo di azione delle dinamine e di Drp-1. Un modello propone che queste proteine funzionino da meccanoenzimi, che partecipano attivamente alla costrizione e scissione delle membrane, l'altro modello, invece, prevede che agiscano non direttamente ma reclutando e attivando un effettore, che medierebbe la curvatura e la fissione [83]. Probabili effettori sono le endofiline, in particolare l'Endofilina 1, una proteina presinaptica che coopera con le dinamine per mediare la curvatura della membrana e la gemmazione delle vescicole durante l'endocitosi. Tuttavia, l'interazione tra Drp-1 e le endofiline non è stata ancora individuata. Drp-1 normalmente si trova nel citoplasma e si accumula sui mitocondri, nei siti di fissione [82], il suo reclutamento a livello dei mitocondri, avviene attraverso la proteina mitocondriale Fis1, una piccola proteina di fissione caratterizzata all'estremità C terminale da un'elica transmembrana [84]. Sebbene Fis1 e Drp-1 siano i regolatori chiave della fissione mitocondriale nei mammiferi, anche altre proteine sono coinvolte in questo processo. Tra queste un analogo della proteina di lievito Mdv1p.

1.6.2 Fusione mitocondriale

I mitocondri fondono utilizzando diversi meccanismi, più complessi di quelli che legano le membrane di altri organelli. Ciò potrebbe riflettere l'origine endosimbiontica di questi organelli che hanno due membrane una esterna ed una interna con diversa composizione sia lipidica che proteica. Come altri eventi che regolano la fusione tra membrane i mitocondri sono all'inizio fusi insieme con la loro membrana esterna e poi con la membrana interna in una miscela a doppio strato. Il meccanismo di fusione, nonostante

sia collegato a quello di fissone, utilizza un set di proteine effettrici evolutivamente conservate ma diverse da quelle della fissione. Tra queste ci sono le proteine trans membrana ad attività GTPasica Mfn1 e Mfn2 [85] chiamate Fzo1 nei lieviti. Mfn è caratterizzata da un dominio N-terminale, ad attività GTPasica, simile a quello delle dinamine e un dominio C-terminale omologo a Fzo, il quale contiene un dominio transmembrana [86]. In diversi esperimenti è stato visto che in alcune linee cellulari, la coespressione di Mfn2 e del dominante negativo di Drp-1 risulta in mitocondri interconnessi e allungati [85]. OPA-1, nota come Mgm1p nei lieviti, è un altro fattore implicato nella fusione mitocondriale, si tratta di una proteina ad attività GTPasica ma la sua funzione e localizzazione subcellulare sono distinte da quelle di Drp-1. In lievito la delezione dell'ortologo di OPA-1, MGM1, comporta un'estesa frammentazione mitocondriale, la perdita del DNA mitocondriale, una respirazione deficitaria ed una abnorme struttura delle creste [87]. E' probabile che OPA-1 e Mfn collaborino nella fusione mitocondriale come fanno gli ortologi di lievito, sebbene i meccanismi non siano stati ancora dimostrati. OPA-1 si trova nella membrana mitocondriale interna dalla parte dello

spazio intermembrana. Tuttavia è stato riportato che OPA-1 sia presente anche sulle creste, nello spazio intermembrana e persino sulla membrana esterna [88]. E' noto che esistono diverse forme di OPA-1 con diverso peso molecolare che quindi potrebbero avere funzioni e localizzazione cellulare diverse [88].

1.6.2.1 Mitofusine

Le mitofusine sono ancorate alla membrana esterna mitocondriale attraverso un dominio bipartito trans membrana, così che sia il dominio GTPasico N-terminale e il carbossilterminale superavvolto si affacciano sul citosol. Le mitofusine sono imparentate vagamente con le dinamine, la GTPasi larga è richiesta per l'endocitosi vescicolare e, come le dinamine, queste proteine oligomerizzano e idrolizzano GTP per catalizzare i

riarrangiamenti della membrana che portano alla fusione mitocondriale. La comprensione della fusione mitocondriale nei mammiferi è complicata dalla presenza di due isoforme ubiquitariamente espresse nei vertebrati-specifici, Mfn1 e Mfn2, che possono essere assemblate in omo o etero-oligomeri. Sebbene l'evidenza suggerisca che entrambe Mfn1 e Mfn2 hanno una funzione nella fusione mitocondriale, molte osservazioni indicano che Mfn2 sia meno attiva e/o che possa funzionare diversamente della Mitofusina 1 nel legame e fusione. [89] Così, la forma più semplice di regolazione nelle cellule mammifere è probabilmente collegata al livello d'espressione di Mfn1 e Mfn2. Inoltre è stato dimostrato che nel cervello vi è un'espressione maggiore di Mfn1 mentre di Mfn2 è predominante nei testicoli e nel cuore. Questo tipo di regolazione può spiegare in parte la tessuto specificità delle malattie neurodegenerative associate alle mutazioni Mfn2. In aggiunta, Mfn1, ma non Mfn2, è necessaria per la funzionalità di OPA1, al contrario mutazioni di Mfn2 provocano malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) [90-96]. Analisi dettagliate delle mutazioni che causano CMT2A hanno permesso una visione più approfondita del ruolo delle interazioni tra Mfn1 e Mfn2. CMT2A è una malattia neurodegenerativa progressiva caratterizzata dalla degenerazione degli assoni neuronali sensoriali e motori. La neuropatia periferica specifica caratteristica della CMT2A potrebbe essere spiegata, magari in parte, dal rapporto di Mfn1 e mfn2 nei diversi tipi cellulari. Per esempio, cellule con alti livelli di Mfn1, come nei cardiomiociti, potrebbe proteggere dalla malattia indotta dalla proteina Mfn2 poiché Mfn1 può formare un complesso funzionale con la molecola mutata. Questa complementazione funzionale si verifica in trans tra Mfn1 e mfn2 su mitocondri affiancati. Comunque, cellule che hanno un livello basso di Mfn1 o che richiedono alti livelli di fusione, come lo sono i lunghi neuroni periferici compromessi nella malattia CMT2A, potrebbero risultare particolarmente vulnerabili alle mutazioni puntiformi nella Mfn2. [93] Sotto stimolo apoptotico, l'equilibrio tra la fissione e la fusione è interrotto e i mitocondri

frammentano. Due membri della famiglia pro-apoptotici Bcl-2, Bax e Bak, sono implicati nella dinamica mitocondriale durante la morte cellulare programmata. Interessante è che Bax e Bak influiscono anche sulla fusione mitocondriale nelle cellule non apoptotiche regolando l'assemblaggio della Mfn2 in complessi dal grande peso molecolare. Oltre al ruolo delle proteine pro-apoptotiche della fusione mitocondriale, due membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2 promuovono la fusione mitocondriale nelle cellule di mammifero attraverso un'interazione fisica con Mfn2. Questi risultati mostrano ulteriori ruoli nella dinamica mitocondriale sia per i membri della famiglia Bcl-2 pro- o anti-morte cellulare suggerendo che queste proteine potrebbero esercitare il loro controllo reciproco nella morte cellulare programmata regolando l'assemblaggio delle proteine di fusione. [94-96]

Il coinvolgimento di PINK1 e Parkin nella mitofagia è stato assai investigato in modelli con un danno mitocondriale acuto dato dal disaccoppiante CCCP in grado di dissipare il potenziale di membrana mitocondriale. L'incremento dell'ubiquitinizzazione del numero delle proteine mitocondriali correla con l'induzione della mitofagia. Includendo i fattori della fusione della membrana esterna Mfn1 e Mfn2. Inoltre queste modificazioni post traslazionali sono ridotte in seguito al silenziamento di PINK1 e Parkin. Infatti l'ubiquitinizzazione di Mfn1 e Mfn2 precede la rimozione dei mitocondri danneggiati ed è così un evento che anticipa la mitofagia collegando la dinamica mitocondriale al controllo di qualità mitocondriale che prevede la rimozione dei mitocondri alterati.

1.7 Autofagia

Il termine "autofagia" deriva da un nome greco che significa: "mangiare se stessi" per la prima volta coniato da Christian de Duve più di quarant'anni fa, egli si basò essenzialmente dall'osservazione della degradazione di mitocondri e altre strutture intracellulari all'interno di lisosomi nel fegato di topi perfusi con l'ormone pancreatico,

glucagone. [97] Il mondo scientifico in questi ultimi anni ha “riscoperto” l’autofagia e da studi condotti in diversi laboratori è emerso il grande contributo, la comprensione e l’approfondimento dell’importanza fisiopatologica di questo processo. [98] Attualmente, sono stati identificati dallo screening genetico condotto in lentivirus 32 diversi geni collegati alla mitofagia (Atg), molti di questi geni sono conservati nel lievito, piante, larve, insetti e mammiferi, enfatizzando l’importanza del processo autofagico in risposta al digiuno. [98] Ci sono tre tipi distinti di autofagia: micro-autofagia, macro-autofagia e autofagia chaperonine-mediata; tutte promuovono la degradazione delle componenti citosoliche con i lisosomi. La macro-autofagia guida il cargo-citoplasmatico ai lisosomi e attraverso un intermediario, una vescicola dalla doppia membrana noto come autofagosoma, fondendosi con lisosoma genera l’autofagolisosoma. Nella micro-autofagia, al contrario, le componenti citosoliche sono prese direttamente dai lisosomi stessi attraverso l’invaginazione della membrana lisosomiale. Entrambe micro-autofagia e macro-autofagia sono in grado di fagocitare grandi strutture attraverso meccanismi selettivi e non selettivi. Nell’autofagia chaperonine mediata (CMA) delle proteine marcate sono traslocate attraverso la membrana lisosomiale grazie ad un complesso con le proteine chaperonine (come ad es Hsc-70) che vengono riconosciute dai recettori che risiedono nella membrana lisosomiale associati alla proteina di membrana 2A (LAMP-2A), portando al loro svolgimento e degradazione.

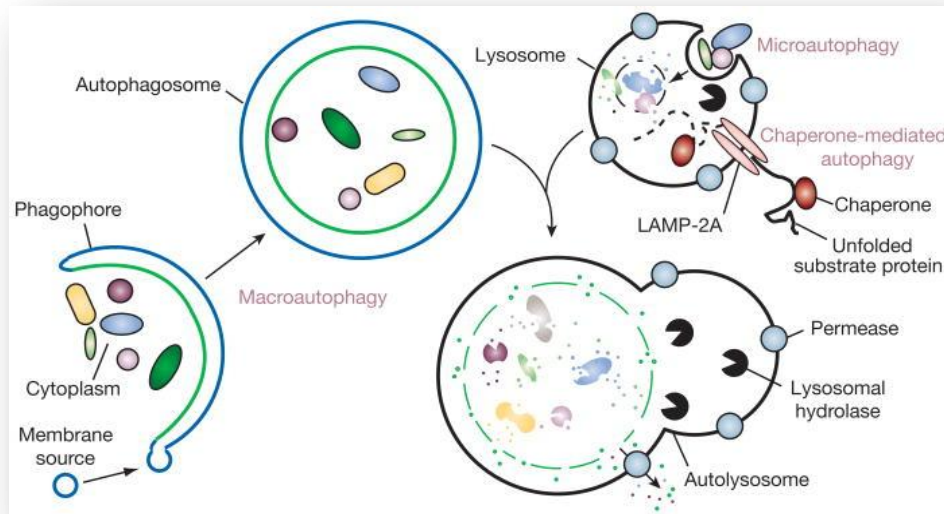


Figura 4: Diversi tipi di autofagia: microautofagia, macroautofagia e autofagia chaperonine mediata.

L'autofagia ha inizio con l'isolamento di una membrana, anche conosciuta come fagoporo che probabilmente deriva da un doppio strato lipidico del reticolo endoplasmatico (ER) e/o da endosomi dell'apparato del Golgi [99,100] in ogni caso l'esatta origine del fagoporo nelle cellule mammiere è controversa. Questo fagoporo si espande per inghiottire il cargo intracellulare come: aggregati proteici, organelli e ribosomi, in tal modo il cargo viene sequestrato in un autofagosoma dalla doppia membrana. [101] Il carico dell'autofagosoma matura attraverso la fusione con il lisosoma, quindi viene promossa la degradazione del contenuto autofagosomiale attraverso le proteasi acide lisosomiali. Permeasi e trasportatori lisosomiali esportano amminoacidi e altri prodotti della degradazione fuori nel citoplasma, dove possono essere riutilizzati per costruire macromolecole e per il metabolismo. [101] Così l'autofagia può essere concepita come una "fabbrica di riciclaggio" cellulare che promuove l'efficienza energetica attraverso la generazione di ATP e media il controllo del danno cellulare attraverso la rimozione di proteine e degli organelli mal funzionali. Questo sistema complesso è regolato da cinque passaggi fondamentali:

1.7.1 Passaggi che caratterizzano il processo autofagico:

A) Induzione: In condizioni di normalità l'autofagia si trova a livelli basali molto bassi; per tale ragione un meccanismo d'induzione autofagica efficiente è cruciale per l'adattamento di un organismo a stress e segnali extracellulari. Il principale inibitore dell'autofagia è una proteina kinasica serina/treonina TOR (target della rapamicina). In presenza di una nutrizione abbondante si è visto che sia nei lieviti che in *Drosophila*, TOR integra le informazioni captate a monte da molteplici vie di trasduzione del segnale e regola negativamente un'altra chinasi serina/treonina, ATG1. Nei lieviti per aver l'inibizione di TOR attraverso il digiuno o con un trattamento di rapamicina, viene attivata l'attività chinastica di ATG1 la quale si lega ad alta affinità con ATG13 e ATG17 formando così un ponte ATG1-ATG13-ATG17 che permette il reclutamento delle proteine ATG nel sito d'assemblaggio del fagoporo (PAS) dando inizio alla formazione dell'autofagosoma. [102-105] Quindi il ruolo del complesso ATG1 nel reclutamento delle proteine è indispensabile per l'induzione autofagica. Inoltre, durante il digiuno in *drosophila*, ATG1 è in grado di inibire la fosforilazione ed attivare un effettore a valle di TOR, S6K, al momento però non è chiaro come il segnale S6K modula le altre proteine autofagiche o l'attività autofagica stessa. Nei mammiferi ci sono due omologhi di ATG1 che sembrano funzionare nell'autofagia, la Unc-51-like kinase (ULK1) e -2 (ULK2) e un omologo dell'ATG17 di lievito, FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting proteina da 200 KD) la quale in stato di digiuno forma un complesso con ULKs e l'ATG13 mammifero e localizza sul fagoporo. [106,107] Riguardo ai substrati della kinasi ATG1 durante il processo autofagico, è ipotizzabile che nei mammiferi ATG13 e FIP200 siano fosforilati da ULKs, e questi autofosforilano permettendo così una modifica conformazionale che induce l'autofagia [108]. A differenza di ciò che è stato riportato per i lieviti, ULKs-ATG13-FIP200 sembrano formare un complesso stabile nonostante le condizioni nutrizionali in cellule mammifere. mTOR interagisce con fosforilasi e inattiva ULKs e ATG13 in una situazione di ricca nutrizione. Sotto l'inibizione di mTOR dovuta al digiuno o al trattamento con rapamicina, ULK1 e ULK2 vengono attivate e fosforilate ATG13 e FIP200 che sono essenziali per l'attività autofagica [109,107]. Questi studi quindi conducono ad un'interessante ipotesi che ATG13 è fosforilato da TOR o

ATG1/ULKs in residui diversi, i quali possono avere effetti opposti nell'autofagia a seconda dello stato di nutrizione. In verità, ATG13 è velocemente defosforilato durante il digiuno [110], mentre la fosforilazione di ATG13 in *Drosophila* è aumentata durante le condizioni autofagiche [111]; è evidente che la fosforilazione di ATG13 dipende maggiormente da TOR nei lieviti, e in larga misura da ATG1 in *Drosophila*. Recentemente è stata identificata una proteina nel complesso ULKs-ATG13-FIP200, ATG101, la quale lega e stabilizza ATG13, ed è richiesta per l'autofagia nei mammiferi.

B) Riconoscimento del carico e selettività: nell'autofagia selettiva i carichi sono riconosciuti attraverso l'interazione con proteine recettori specifiche. Il pathway Cvt nei lieviti guida preApe1 nei vacuoli e genera l'enzima maturo Ape1. Il carico preApe1 contiene un segnale vacuolar-targeting il quale può essere riconosciuto e legato dal recettore proteico ATG19. Una proteina adattatrice, ATG11, lega ATG19 e recluta il complesso ATG19-preApe1 in PAS dove ATG19 interagisce con uno dei componenti chiave nella formazione del macchianario di formazione delle vescicole, ATG8, impacchettando il complesso cargo-recettore nelle vescicole Cvt (analogo agli autofagosomi) [112]. Negli organismi multicellulari, un'importante funzione dell'autofagia è la clearance dei substrati citosolici ubiquitinati o delle proteine aggregate. Recenti studi suggeriscono che questo processo di degradazione è anche selettivo e mediato attraverso una proteina mammifera p62/sequestrosome 1 (SQSTM1) [113] o RefP(2), l'omologo in *Drosophila* di p62(99). p62 lega direttamente entrambi poli- o mono- ubiquitine attraverso il loro dominio ubiquitina-associato (UBA) e l'omologo mammifero ATG8, LC3 (proteina 1 microtubulo-associata catena leggera 3) [114] e legando i carichi ubiquitinati li porta alla macchina autofagica per la loro degradazione. La similarità funzionale e strutturale tra il motivo del C-terminale nei mammiferi p62 e nei lieviti ATG19 [115] supporta maggiormente un'intrigante ipotesi che p62 sia un analogo negli eucarioti superiori di ATG19 e funzioni come un recettore per le proteine ubiquitinate o specifici organelli nell'autofagia selettiva. Uno studio recente ha dimostrato che le proteine granulari P, le cellule germinali determinanti nelle *Caenorhabditis elegans*, sono anch'esse selettivamente degradate dall'autofagia nelle cellule somatiche [116]. Il recettore del carico, SEPA-1 (soppressore dei granuli ectopici P

in mutanti autofagici 1) direttamente interagiscono con i componenti dei granuli P e LGG-1, l'omologo di ATG8 in *C. Elegans* e così si riscontrano altre similarità tra ATG19 e p62.

C) Formazione dell'autofagosoma: Diversamente dai processi di formazione delle vescicole presenti in molti sistemi che si svolgono nelle endomembrane, la doppia membrana degli autofagosomi sembra esser assemblata al PAS grazie all'unione di nuove membrane, piuttosto che esser inizialmente generata dalla gemmazione della superficie di un organello preesistente o dalla chiusura di una singola parte di una membrana continua. Così, la formazione delle vescicole in grado di sequestrare il carico diventa probabilmente il passaggio più complesso dell'autofagia. Diverse proteine ATG sono reclutate nel fagoporo per partecipare alla formazione dell'autofagosoma, e questo passaggio richiede un'altissima coordinazione regolatoria di tutte queste proteine. La nucleazione e assemblaggio della membrana iniziale del fagoporo richiede il complesso di classe III fosfatidilinositolo 3-chinasi (PtdInsK), il quale è composto da myristoylated serine/threonine kinase Vsp15 (p150 nelle cellule mammifere), ATG14 (Matg14 nelle cellule mammifere) e ATG6/ Vsp30 (Beclin1 nelle cellule mammifere) [117,118]. La funzione di Beclin1 nell'autofagia è regolata da Bcl-2 (B-cell linfoma/leucemia), una proteina antiapoptotica che inibisce l'autofagia legando e sequestrando Beclin1 quando le condizioni nutrizionali sono ricche; la dissociazione di Beclin1 da Bcl-2 è indispensabile per l'induzione dell'autofagia. Il complesso PtdIns3K produce PtdIns3P (fosfatidilinositolo 3-fosfato) ed è coinvolto nella segnalazione di PAS da un numero di proteine di lievito che legano PtdIns3P come ATG18, ATG20, ATG21, e ATG24 [119]. Nei lieviti ATG20 e ATG24 interagiscono con il complesso ATG1-ATG13-ATG17 che è l'intermedio dell'induzione dell'autofagia; comunque gli omologhi mammiferi di ATG20 e ATG24 sono ancora entrambi non identificati o non ben caratterizzati nell'autofagia. Il complesso PtdIns3K in parte insieme ad altre proteine ATG, favorisce il reclutamento di due sistemi di coniugazione, uniti tra loro ubiquitine-line (Ubl) ATG12-ATG5-ATG16 e ATG8-PE (fosfatidiletanolammine) al fagoporo i quali hanno un ruolo centrale nella regolazione dell'elongazione della membrana e dell'espansione dell'autofagosoma che si sta formando. Le due proteine Ubl, ATG12 e ATG8 sottostanno alla coniugazione allo

stesso modo dell'ubiquitina. Atg12 è attivata da Atg7 (enzima attivante E1), trasferita ad ATG10 (enzima coniugante E2) e attaccato covalentemente alla lisina iniziale del substrato proteico ATG5. Al contrario dell'ubiquitinizzazione il legame ATG12-ATG5 è costitutivo e irreversibile, e apparentemente equivalente ad una ligasi non substrato specifico E3, è richiesto in questo processo. Così il coniugato ATG12 e ATG5 interagisce con la proteina ATG16 superavvolta, la quale lega il complesso ATG12-ATG5-ATG16 in una trama attraverso una propria oligomerizzazione e attacca il fagoporo [120,121]. Nel sistema di coniugazione ATG8, l'ATG8 è il primo ad essere processato da una proteasi cisteinica, ATG4, esponendo al C-terminale i residui glicinici. Lo stesso enzima E1 ATG7 attiva ATG8 e lo trasferisce a ATG13 (E2). In fine ATG8 viene coniugato al target lipidico PE grazie ad un legame amminico, facilitato dalla coniugazione E3-like ATG12-ATG5, benchè il complesso ATG12-ATG5 manchi dei domini conservati HECT o ad anello posseduti dalle tipiche ligasi E3, ciò non è essenziale per la coniugazione. In una dieta ricca, la maggior parte degli ATG8 sono citosolici; in caso d'autofagia indotta, ATG8 esiste come forma di coniugato lipidico ed è localizzato in entrambe le parti del fagoporo. ATG8 controlla la grandezza dell'autofagosoma la quale probabilmente risulta dalla capacità di determinare la curvatura della membrana. La lipidazione di ATG8 e dell'omologo mammifero LC3 è largamente utilizzato per monitorare l'autofagia. Diversi elementi, compresi i mitocondri, il complesso del Golgi, il Reticolo Endoplasmatico, si ipotizza siano originati dalla membrana dell'autofagosoma [122]. Ugualmente non è ancora molto chiaro come il meccanismo di unione delle membrane sia organizzato e fuso con il crescente fagoporo.

d) Fusione delle vescicole e degradazione dell'autofagosoma: Quando la formazione dell'autofagosoma viene completata, ATG8 che è attaccata alla membrana esterna viene clivata da PE grazie ad ATG4 e rilasciata nuovamente nel citosol [123]. La fusione dell'autofagolisosoma è guidata dalla stessa macchina che è coinvolta nella fusione delle membrane dei vacuoli omotipici. Nelle cellule mammiferi gli eventi di fusione richiedono la proteina lisosomiale di membrana LAMP-2 e la piccola GTP_ase Rab7

[124] ma il meccanismo è meno caratterizzato. Dopo la fusione, la degradazione delle vescicole interne è dipendente da una serie di acidi idrolasici lisosomiali/vacuolari, che includono le proteinasi A e B (codificati da PEP4 e PRB1, rispettivamente) e nei lieviti dalla lipasi ATG15 e catepsina B, D (un omologo della proteinasi A) e L nelle cellule mammifere [125]. In condizioni di digiuno le piccole molecole risultanti dalla degradazione, in particolare aminoacidi, sono trasportate nuovamente al citosol per sintetizzare proteine e mantenere le funzioni cellulari. L'identificazione di ATG22 insieme ad altre permeasi vacuolari (come Avt3 e Avt4) come aminoacidi vacuolari rilasciati durante l'autofagia in lieviti [126], è stato d'aiuto per capire il meccanismo di riciclaggio dei nutrienti, queste permeasi rappresentano l'ultimo step nella degradazione del processo di riciclaggio.

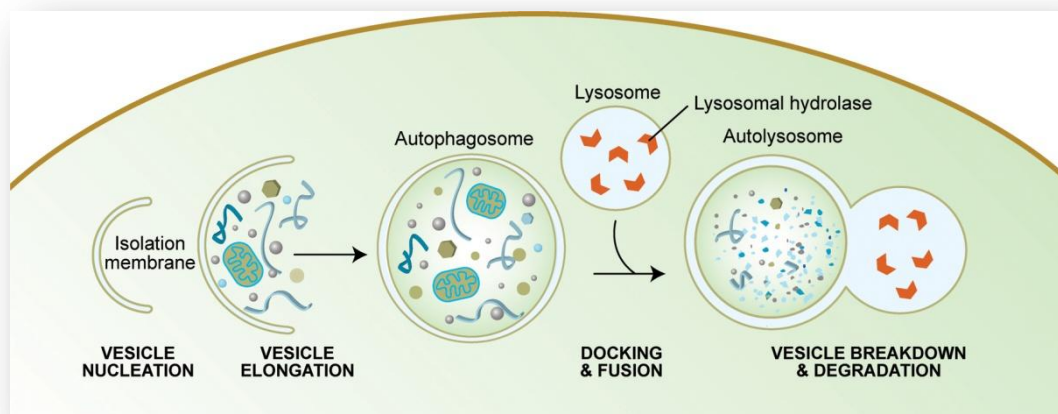


Figura 5:Disegno schematico dei passaggi dell'autofagia: A) Induzione, B) Riconoscimento del carico e selettività con elongazione delle vescicole, C) Formazione dell'autofagosoma, D) Fusione delle vescicole e degradazione dell'autofagosoma

1.8 Mitofagia

1.8.1 Premessa, nozioni generali

I mitocondri sono organelli essenziali che regolano l'omeostasi energetica cellulare e la morte della cellula. La rimozione dei mitocondri danneggiati attraverso un processo chiamato "mitofagia" è essenziale per il mantenimento delle funzioni cellulari. In verità, recentemente è stato proposto che la mitofagia giochi un ruolo importante anche nel differenziamento terminale delle cellule rosse del sangue, nella degradazione dei mitocondri paterni, nelle malattie neurodegenerative e nei tessuti danneggiati per ischemia farmaco indotta. La rimozione dei mitocondri danneggiati attraverso l'autofagia richiede due passaggi: L'induzione di un'autofagia generale e la preparazione dei mitocondri danneggiati per il riconoscimento autofagico. Studi recenti hanno dimostrato che il riconoscimento mitocondriale è mediato dal pathway di segnale PINK1/ PARKIN e dai recettori NIX e BNIP3. Benchè inizialmente si pensasse che l'autofagia fosse un meccanismo di degradazione non selettivo, ora è ampiamente accettato che esistono due tipi di autofagia: non selettiva e selettiva. In risposta al digiuno o alla privazione di nutrienti viene attivata un'autofagia non selettiva per fornire alle cellule gli amminoacidi essenziali e i nutrimenti per la sopravvivenza. Al contrario l'autofagia selettiva si manifesta per rimuovere specificatamente organelli danneggiati, in esubero o aggregati proteici anche in condizioni di buona nutrizione. Fino ad ora diversi processi autofagici cargo - specifici sono stati riportati in organismi sia di lieviti che in mammiferi quali: rimozione specifica di perossisomi (pexophagy) [127], reticolo endoplasmatico (erphagy) [128], ribosomi (ribophagy) [129,130], aggregati lipidici (liphofagy) [131], microbi (xenophagy) [132] e aggregati proteici [133,134]. In oltre un tipo di autofagia selettiva ben studiata è la mitofagia la quale specificatamente rimuove i mitocondri danneggiati o in sovra numero. De Duve e Wattiaux [135] per primi coniarono il termine

“autofagia” per descrivere il processo caratterizzato dal sequestro di porzioni di citoplasma da parte di vescicole delimitate da una doppia membrana: autofagosomi. Quando diedero ai ratti glucagone osservarono che vi era un forte incremento del numero di autofagosomi e che avevano sequestrato i mitocondri. Xue et al. [136] dimostrarono inoltre che i mitocondri venivano spesso fagocitati da autofagosomi dalla doppia membrana in cellule neuronali private di fattori di crescita nervosa. Lo stesso gruppo mostrò anche che tutti i mitocondri potevano scomparire quando le cellule venivano trattate con stimoli apoptotici in presenza di inibitori generici delle caspasi. Successivamente, Lemaster [137] ed i suoi collaboratori dimostrarono che in una coltura di cellule epatiche di topo trattate con glucagone in assenza di siero, spesso si osservavano mitocondri depolarizzati colocalizzati con lisosomi acidi e autofagosomi GFP-LC3 positivi [138]. E venne così coniato un termine per questo processo autofagico selettivo dove venivano eliminati specificatamente i mitocondri: “mitofagia”. In questi ultimi anni ci sono stati rapidi progressi nello studio della mitofagia che hanno permesso di comprendere maggiormente i meccanismi molecolari e il ruolo fisiopatologico nello sviluppo di alcune malattie. Wen-Xing Ding 2011 [139] propose dei modelli di mitofagia nelle cellule mammifere. In queste mostrò un modello di mitofagia a due steps: l’induzione della macroautofagia con il canonico sistema Atg-dipendente e l’adescamento dei mitocondri. L’induzione dell’autofagia canonica richiede le proteine Atg e per di più coinvolge la soppressione di mTOR attraverso la produzione di ROS generata dal danno mitocondriale, dalla deplezione-mediata di ATP e dall’attivazione di AMPK. Il riconoscimento dei mitocondri è mediato da un meccanismo multiplo che potrebbe essere Parkin dipendente o Parkin indipendente. In presenza di Parkin, un metodo comune d’induzione della mitofagia è la depolarizzazione mitocondriale (ad esempio con un trattamento con disaccoppiante CCCP), in tal caso si ha un clivaggio disaccoppiato di PINK PARL-mediato, portando alla stabilizzazione di PINK e al

reclutamento di Parkin sul mitocondrio. Parkin localizzato sul mitocondrio promuove l'ubiquitinizzazione delle proteine della membrana esterna, le quali possono essere degradate attraverso il proteasoma o servire come molecole di legame per p62. La proteina p62 può a sua volta agire come adattatore molecolare attraverso l'interazione diretta con LC3 per reclutare le membrane degli autofagosomi verso i mitocondri. Parkin può anche interagire con AMBRA1 che a turno attiva il complesso PI3K attorno ai mitocondri per facilitarne la mitofagia selettiva.

Per quanto riguarda il meccanismo Parkin indipendente, l'ipossia, che danneggia i mitocondri, può aumentare l'espressione di FUNDC1 e NIX, i quali reclutano a loro volta gli autofagosomi verso i mitocondri attraverso un'interazione diretta con LC3 grazie ai loro domini LIR. In seguito alla depolarizzazione, SMURF1 anch'esso target mitocondriale, promuove la mitofagia attraverso la poliubiquitinizzazione delle proteine mitocondriali. Hsp90-Cdc37 stabilizza ed attiva ULK1 il quale fosforila Atg13, una volta fosforilato Atg13 viene reclutato dai mitocondri danneggiati per promuovere la mitofagia.

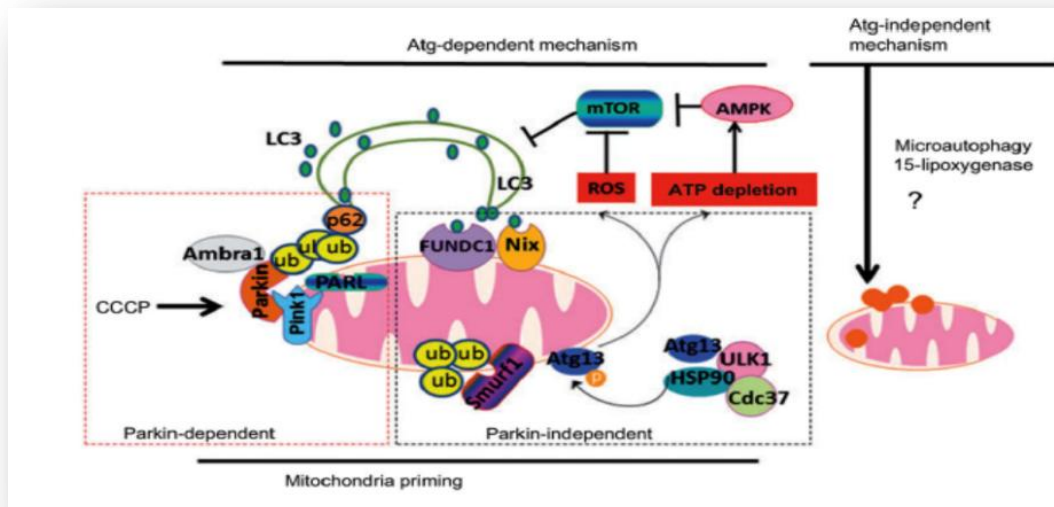


Figura 6: Modelli proposti per la mitofagia nelle cellule di mammifero: PINK-Parkin mediato o Parkin indipendente.

1.8.2 Funzioni e caratteristiche di PINK1 nei mitocondri

La chinasi PTEN-indotta è una chinasi serina/treonina bersaglio mitocondriale, la quale è associata alla malattia famigliare di Parkinson autosomica recessiva. [140]

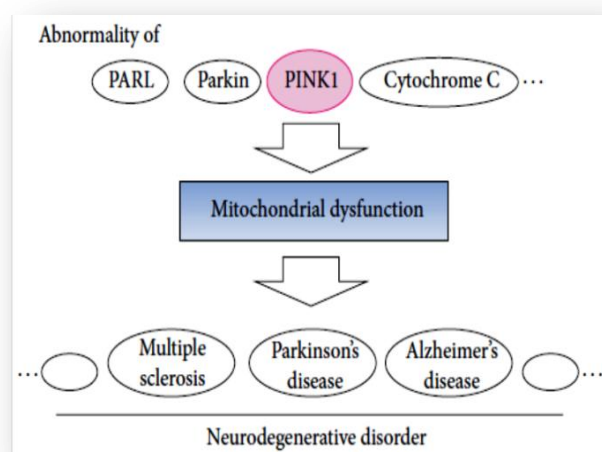


Figura 7: Disfunzioni mitocondriali causate da PINK, Parkin come malattie neurodegenerative come la malattia di Parkinson. Le anomalie di queste proteine possono anche essere la causa di disfunzioni mitocondriali.

Oltre al suo ruolo protettivo contro le disfunzioni mitocondriali e all'apoptosi, PINK1 è anche conosciuta per regolare Parkin proteina associata alla malattia di Parkinson. [140] PINK1 recluta l'E3 ubiquitina ligasi Parkin verso i mitocondri con lo scopo d'iniziare la mitofagia. Inoltre la proteasi presenilina associata serina romboidale – simile PARL può influire nella processazione proteolitica di PINK1. [141]. La normale localizzazione di PINK1 e la sua stabilità richiedono l'attività catalitica di PARL. Si è visto anche che la mancanza di PARL indebolisce il reclutamento di Parkin nei mitocondri, suggerendo che la processazione e localizzazione di PINK1 sono necessarie per determinare la loro interazione con Parkin [142]. Sono state mappate più di 50 mutazioni di PINK1 ed i domini regolatori chinasi e carbossilterminale di PINK1 che hanno un diverso effetto sulla stabilità proteica sono coinvolte nelle funzioni neuroprotettive. [143] Le mutazioni di PINK1 sono la più comune causa della malattia familiare recessiva di Parkinson [143,144]. Il gene PINK1 è formato da 8 esoni, codificanti per 581 amminoacidi proteici con una massa molecolare stimata circa 62.8 KDa. Difetti in PTEN, che è un soppressore tumorale, sono stati trovati in diversi tumori cresciuti in una varietà di tessuti umani. L'mRNA di PINK1 è espresso ubiquitariamente, ma alti livelli d'espressione sono stati riscontrati nel cuore, nel muscolo scheletrico e nel cervello [145]. Nel cervello, la maggior espressione è neuronale nella sostanza nera, nell'ippocampo e nelle cellule cerebellari del Purkinje [146]. La proteina PINK1 ha un dominio centrale con un'omologia serina treonina chinasi, mostrando *in vitro* un'attività di auto fosforilazione [147]. Un dominio amino-terminale di targeting mitocondriale è sufficiente per l'introduzione mitocondriale di PINK1.

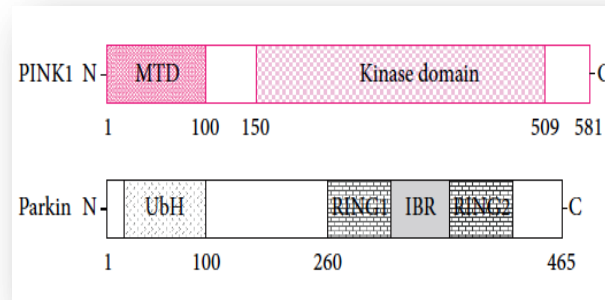


Figura 8:Immagine schematica che mostra la struttura dominica delle proteine PINK (sopra) e Parkin (sotto). MTD: Dominio di targeting mitocondriale, UbH dominio omologo dell'ubiquitina, RING 1 e RING2

La proteina può essere trovata sia nella membrana esterna che nelle membrana interna [148].

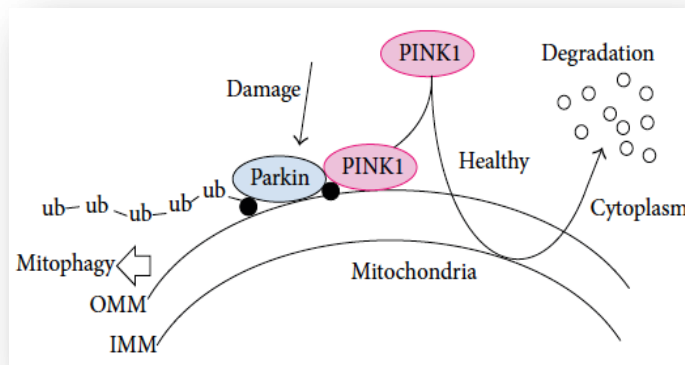


Figura 9:Rappresentazione schematica ipotetica del pathway di regolazione di PINK1 e mitofagia Parkin mediata. In caso di danno mitocondriale PINK1 e Parkin si accumulano nella membrana esterna del mitocondrio. Parkin ubiquitinizza i substrati indifferentemente (cerchi neri) risultando nell'induzione della mitofagia.

PINK1 può essere processato in due forme più corte, le quali sono distribuite nei compartimenti sia mitocondriali che citosolici. I substrati fisiologici di PINK1 sono localizzati nella membrana mitocondriale esterna o possibilmente sul citosol vicino alla

superficie mitocondriale. PINK1 citoplasmatica viene degradata dal proteasoma [149]. PINK1 può anche interagire con Beclin, una proteina chiave pre-autofagica implicata nella patogenesi dell'Alzheimer e nella malattia di Huntington [150]. PINK1 quando è di lunghezza intera interagisce con Beclin [151] che dà inizio all'autofagia digiuno indotta. La proteasi PARL si è visto essere in grado di mediare il clivaggio di PINK1 nei mitocondri, il quale può mediare diversi clivaggi PINK1 e della fosfoglicerato mutasi5 (PGAM5) a seconda dello stato di salute dei mitocondri.

1.8.3 PINK1, funzioni coinvolte nello stato di salute mitocondriale

Il silenziamento di PINK1 può causare la disfunzione della catena respiratoria mitocondriale, anche i topi knockout per PINK1 mostrano una respirazione mitocondriale indebolita e una diminuita attività di fosforilazione. Inoltre, l'indebolimento della respirazione mitocondriale può essere aggravato attraverso l'esposizione dei mitocondri ad uno shock termico [152]. Mentre studi dove hanno downregolato PINK1 endogena hanno dimostrato il ruolo chiave di PINK1 nel mantenimento della rete mitocondriale funzionante e che l'attività protettiva di PINK1 dipende dalla sua localizzazione mitocondriale. La perdita di PINK1 provoca alterazioni severe nell'omeostasi mitocondriale com'è evidente dall'aumento delle specie reattive dell'ossigeno ROS mitocondriali. [153] Si è visto che PINK1 protegge anche contro la morte cellulare indotta dall'inibizione del proteasoma e dal danno ossidativo. Così PINK1 ricopre un ruolo fondamentale nel sistema di controllo qualità mitocondriale attraverso la stabilizzazione dei mitocondri, la fosforilazione delle chaperonine, la regolazione della mitofagia. Ugualmente, l'induzione sbilanciata del riciclo mitofagico può contribuire all'atrofia neuronale, alla degenerazione neuritica, e alla morte delle cellule neuronali [154]. Un tasso eccessivo di mitofagia può dare risultati dannosi. [154] La sovraespressione di PINK1 wild-type nelle cellule neuronalistabilisce il ripristino delle

reti mitocondriali attraverso il mantenimento del potenziale di membrana e della soppressione della mitofagia. [155] Probabilmente, alti livelli citoplasmatici di PINK1 possono sostituire la proteina endogena attraverso la fosforilazione dei substrati della superficie mitocondriale o nel citoplasma vicino alla superficie del mitocondrio. Nei mitocondri sani, PINK1 è rapidamente degradato in un processo che coinvolge sia le proteasi mitocondriali che il proteosoma. La proteasi mitocondriale PARL può influire nella processazione proteolitica di PINK1 e nella normale localizzazione di PINK1, e la stabilità richiede l'attività catalitica di PARL. [156] PARL potrebbe anche far da mediatore nel clivaggio differenziale di PINK1 che dipende dallo stato di salute dei mitocondri. La mancanza di PARL danneggia il reclutamento di PARKIN ai mitocondri, suggerendo che la processazione e la localizzazione di PINK1 sono importanti nella sua interazione con Parkin. Con un danno mitocondriale severo, PINK1 facilita l'aggregazione dei mitocondri depolarizzati attraverso l'interazione con la proteina PARKIN. [157] Inoltre la sovraespressione dell'intera (full-length) di PINK1 è richiesta per il reclutamento di PARKIN mitocondriale e per l'aggregazione dei mitocondri. Per di più, la sovraespressione transiente di Parkin aumenta per più tempo la mitofagia in cellule neuronali prive di PINK1, risultando nella citoprotezione e/o ripristino delle reti d'interconnessione mitocondriale. Diverse linee evidenziano interazioni specifiche di PINK1 con Parkin nel promuovere l'omeostasi mitocondriale. Parkin può essere fosforilato da PINK1 nel suo dominio ad anello nelle reazioni chinasiche *in vitro*, così può promuovere la traslocazione di Parkin ai mitocondri. [158] Inoltre, è stato riportato che la fosforilazione di Parkin facilita la pulizia selettiva dei mitocondri depolarizzati attraverso la mitofagia. [159] In condizioni dove PINK1 risulta diminuita o assente, viene compromesso il controllo di qualità mitocondriale. La mancanza del controllo di qualità successivamente contribuisce alla morte cellulare. Nei mitocondri sani, by the way, PINK1 viene velocemente degradata in un processo che coinvolge sia le proteasi

mitocondriali che il proteosoma. La perdita di PINK1 e Parkin porta alla frammentazione dei mitocondri [160.] Di contro, Parkin mitocondriale promuove la degradazione mitofagica dei mitocondri malfunzionanti. [150]. La risposta mitofagica in cellule silenziate per PINK1 può essere associata all'incremento dei livelli di Parkin, come l'espressione della proteina Parkin endogena risulta aumentata in cellule prive di PINK1. [161] Quindi PINK1 e Parkin partecipano complexy in un pathway di segnale mitocondriale protettivo.

1.1.4 Parkin promuove la poliubiquitinizzazione delle proteine mitocondriali

Successivamente alla traslocazione mitocondriale, l'attività E3 ubiquitinasi di Parkin sembra aumentare. [162] Parkin media la formazione di due tipi di catene di poliubiquitina: una catena di 48 lisine (K) associate alla degradazione proteasomica del substrato, e una catena di 63 lisine (K) associate alla degradazione autofagica. Benchè la poliubiquitinizzazione Parkin mediata dei substrati mitocondriali sembra essere il meccanismo più probabile attraverso il quale viene innescata la mitofagia [163].

I dettagli di come avviene rimangono ancora sconosciuti. In un modello, Parkin media la formazione di 48K catene sopra delle proteine specifiche della membrana mitocondriale esterna ed è la degradazione proteasomica di queste che fa innescare la mitofagia. In supporto a questo modello l'inibizione dell'attività proteasomica previene la mitofagia dei mitocondri danneggiati [164]. Nel secondo modello, Parkin provoca la formazione di di catene di ubiquitina K63 o K27 che si legano alla superficie esterna mitocondriale, e queste ubiquitinate, piuttosto che indurre la degradazione proteoasomica, iniziano una segnalazione a cascata che attiva la mitofagia.

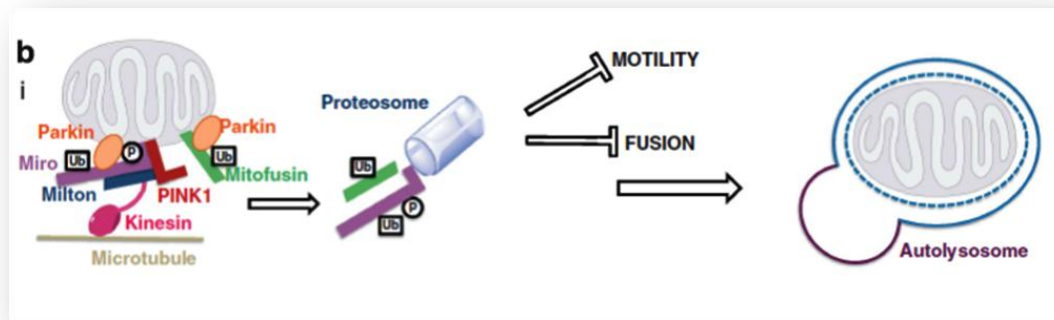


Figura 10: In questo meccanismo proposto Parkin probabilmente attraverso la sua attività ubiquitin-ligasica, provoca la degradazione dei substrati come Miro e Mitofusina1. In questo caso Miro è fosforilato da PINK a monte della degradazione proteasomica Parkin dipendente. La frammentazione mitocondriale e l'arresto della motilità, attraverso la perdita di Mitofusina e Miro, isolando i mitocondri danneggiati e promuovendo l'inglobamento nell'autofagosoma.

In supporto a questo modello, Geiser et al. [163] trovarono un'abbondanza di catene ubiquitinate K63 e K27 Parkin- indipendenti e identificarono l' ubiquitinizzazione di VDAC, proteina della membrana esterna, un componente del poro di transizione della permeabilità, elemento essenziale per la mitofagia. Comunque il reclutamento di VDAC ubiquitinato per la mitofagia è stato dimostrato in molti altri studi. Infatti è possibile che la sola presenza di alti livelli di poliubiquitinizzazione di un particolare substrato, sia sufficiente per l'induzione della mitofagia. Questa ipotesi è in accordo con la capacità ectopica di Parkin di targhettare verso i perossisomi per mediare l'ubiquitinizzazione della superficie mitocondriale e la degradazione autofagica di questi organelli. Riassumendo, mentre l'attività ubiquitin-ligasica di Parkin è ben stabilita, ulteriori lavori sono richiesti per determinare come l'ubiquitinizzazione Parkin mediata promuove la mitofagia.

1.8.5 Interazione di PINK1 e Parkin con il cuore del macchinario autofagico

La mitofagia Parkin-mediata richiede i componenti del cuore del macchinario autofagico. Specificatamente, bloccando le attività di Atg3, Atg5, Atg7 e PI3K di classe III prevencono la degradazione dei mitocondri trattati con CCCP. Come fa il pathway PINK1/ Parkin ad interagire ed attivare il macchinario autofagico? La proteina adattatrice p62/ SQSTRM1 ubiquitin-binding si accumula nei mitocondri depolarizzati e ciò è stato proposto per facilitare il reclutamento dei mitocondri danneggiati verso gli autofagosomi attraverso il legame di LC3. [165]

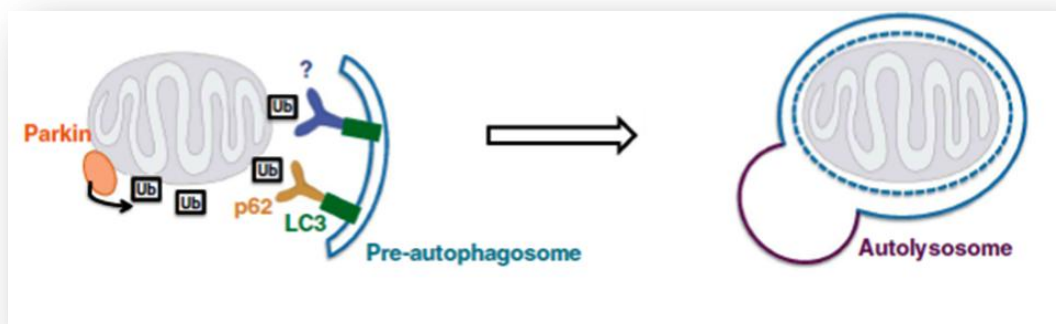


Figura 11: Parkin iper-ubiquitinizza la membrana mitocondriale esterna e viene riconosciuta dagli adattatori che legano l'ubiquitina come p62, HDAC6, che reclutano i mitocondri danneggiati verso la membrana isolata del pre-autofagosoma attraverso l'interazione con la proteina LC3.

Ugualmente non è chiaro se p62 sia necessario nella mitofagia Parkin-mediata, poiché si verifica una degradazione dei mitocondri alterati anche in assenza di p62. Ne il reclutamento dei mitocondri danneggiati verso l'isolamento delle membrane preesistenti potrebbe spiegare come Parkin possa stimolare la formazione di nuove membrane isolate. [166] Recenti studi suggeriscono che PINK1 e Parkin possono direttamente interagire con il complesso Beclin-PI3K. Il reclutamento di AMBRA1 Parkin-dipendente,

un attivatore del complesso Beclin1 e nucleazione delle membrane pre-autofagosomiali attorno ai mitocondri danneggiati. Perciò entrambe le funzioni di Parkin, vale a dire, l'ubiquitinizzazione delle proteine della membrana esterna e il reclutamento di AMBRA1, possono contribuire alla mitofagia dei mitocondri danneggiati. L'E3 ubiquitina ligasi SMURF1 si è visto essere reclutata nella mitofagia Parkin-dipendente. L'esatta funzione di SMURF nell'autofagia non è ancora chiara, ma esperimenti hanno dimostrato che il suo dominio di targeting sulla membrana e non la sua attività ubiquitin-ligasi, sia necessaria. Sulla base di queste considerazioni è stato proposto che SMURF1 potrebbe essere coinvolto nello spostamento dei mitocondri verso gli autofagosomi. In aggiunta al suo ruolo nella mitofagia dei mitocondri danneggiati, con quelli sani ed organelli funzionali. [167] In caso di depolarizzazione Parkin provoca la degradazione del repressore trascrizionale PARIS. La perdita di PARIS provoca il rilascio del fattore di trascrizione biogenesi mitocondriale PGC1 α per attivare così i suoi geni target. Concludendo possiamo dire che la parte centrale del pathway della mitofagia PINK1/Parkin è un importante regolatore dell'omeostasi mitocondriale. Ovviamente ancora molte domande sono irrisolte ad esempio: Come PINK1 governa il reclutamento di Parkin? Come Parkin interagisce con i diversi componenti del macchinario autofagico e regolano la mitofagia nei diversi passaggi della formazione e maturazione dell'autofagosoma? Come le diverse funzioni di Parkin quali la mitofagia, la biogenesi mitocondriale vengono stimulate in maniera coordinata? Ugualmente diverse osservazioni supportano le seguenti conclusioni; primo: né gli uomini né gli insetti con mutazioni nel pathway PINK1/Parkin sembrano prevalentemente normali ed hanno solo un fenotipo lieve, che non sarebbe se il turnover dei mitocondri danneggiati fosse completamente bloccato. Ciò che rimane da essere scoperto è quali altri pathway paralleli contano nel turnover mitocondriale in assenza di PINK1 e Parkin.

1.8.6 Mitofagia e dinamica mitocondriale

Quando si parla di mitofagia non bisogna dimenticare che i mitocondri oltre ad avere meccanismi che regolano la loro biogenesi e l'eliminazione dei mitocondri disfunzionali, sono organelli dinamici, vanno costantemente incontro ad eventi di fissione e fusione. Il bilanciamento tra la fissione mitocondriale e la fusione è controllato da proteine processo-specifiche, e la perdita o l'acquisizione delle funzioni di ciascuna delle componenti altera drasticamente la dinamica mitocondriale, provocando un'alterazione della forma dei mitocondri, passando da quella frammentata a quella allungata [168], ma anche della funzionalità mitocondriale. Per mantenere la funzionalità dei mitocondri nella popolazione cellulare è richiesta la selettiva degradazione dei mitocondri in modo coordinato agli eventi di fissione e fusione.

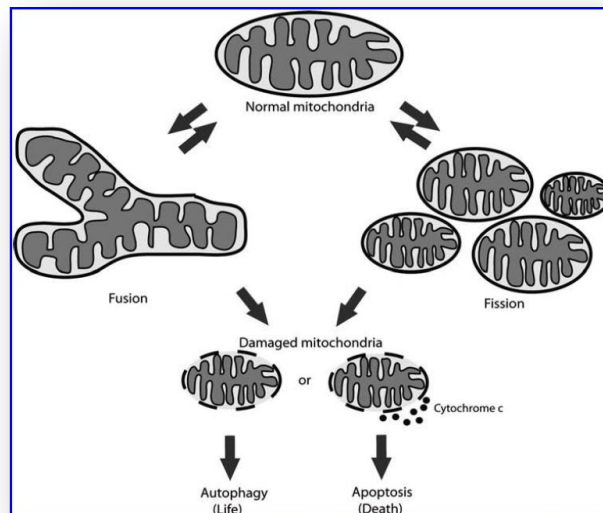


Figura 12:Relazione tra la fissione la fusion, l'apoptosi e la mitofagia. In condizioni di normalità i mitocondri ciclicamente cambiano la loro forma per preservare le loro funzioni. La fusione genera un network mitocondriale che incrementa il numero di mitocondri. La fissione mitocondriale invece spinge i mitocondri danneggiati verso la degradazione attraverso la mitofagia. Danni maggiori provocano l'apoptosi dei mitocondri.

Attraverso l'evoluzione di un processo conservato d'autofagia, il quale non-selettivamente o selettivamente catabolizza componenti cellulari e organelli, i mitocondri sono degradati in risposta ad alterazioni della domanda metabolica o danni che non potrebbero essere riparati in altro modo (ad esempio attraverso eventi di fissione e fusione). Recentemente due gruppi di ricercatori hanno dimostrato come l'autofagia digiuno-mediata influenzi la morfologia mitocondriale [169]. E' stato dimostrato che durante il digiuno i mitocondri si allungano attraverso la fosforilazione di Drp1 grazie alla proteina chinasi A (PKA) in risposta all'incremento di cAMP. La fosforilazione di Drp1 inibisce la sua attività come proteina di fissione mitocondriale, risultando nell'elongazione dei mitocondri che conseguentemente sfuggono alla degradazione autofagica. Un altro regolatore chiave della dinamica mitocondriale è il fattore di trascrizione High-mobility group box 1 (HMGB1) che regola l'espressione genica della heat-shock protein beta 1 (HSPB1). Per questo gli autori suggeriscono che HMGB1 e HSPB1 regolino il controllo di qualità mitocondriale e proteggano le cellule dai mitocondri anomali attraverso l'attivazione dell'autofagia e mitofagia. La fissione mitocondriale serve quindi come prerequisito per l'eliminazione dei mitocondri in condizioni fisiologiche o patologiche ed è integrata con il processo di riconoscimento per la cattura dei mitocondri.

Per comprendere nello specifico i meccanismi che governano e mettono in relazione la dinamica mitocondriale (fissione/fusione) con la mitofagia ripartiamo dalla traslocazione di Parkin dal citoplasma ai mitocondri. Infatti è stato dimostrato che Parkin trasloca esclusivamente verso i mitocondri difettati lasciando di mitocondri sani Parkin-liberi [170]. Successivamente al reclutamento di Parkin si ha una riduzione della massa mitocondriale, i.e. mitofagia. Infatti in accordo è stato proposto che Parkin influenzi il sistema di controllo qualità mitocondriale attraverso la mitofagia e governi la rimozione selettiva dei mitocondri danneggiati. Risultati ottenuti *in vitro* in colture cellulari hanno nuovamente

mostrato che l'overespressione di PINK1 è sufficiente per far traslocare Parkin anche in assenza di trattamento con disaccoppianti [171]. In che modo PINK1 localizzata nei mitocondri recluti Parkin dal citoplasma non è ancora stato capito, ma possibili meccanismi di reclutamento sono stati proposti. nel primo PINK1 interagisce direttamente con Parkin [172] in un modo che non dipende ne dall'attività chinasi di PINK1 ne dall'attività di Parkin E3 ligasi [173]. Nel secondo, il dominio che si affaccia al citoplasma della chinasi PINK1 è in grado di fosforilare Parkin [171,173] provocando la traslocazione di Parkin verso i mitocondri e di conseguenza la sua attivazione permette l'ubiquitinizzazione dei suoi substrati mitocondriali. In ogni caso esperimenti condotti su insetti e hanno suggerito altri regolatori della traslocazione di Parkin verso i mitocondri e che l'overespressione di Parkin in cellule prive di PINK1 salva dal fenotipo PINK1 mutato [171]. Perciò chi contribuisce a monte a far traslocare Parkin vicino a PINK1 per la sua fosforilazione rimane ancora sconosciuto. E' stato preposto che la fissione mitocondriale precede la mitofagia, con il proposito di trasformare mitocondri normalmente allungati in mitocondri con una forma corpuscolare adatta ad essere inghiottita dal macchinario autofagico. [174] Il blocco della fusione è una possibile azione che potrebbe permettere alle proteine della fissione di ridisegnare la popolazione mitocondriale. Così, numerosi gruppi di ricercatori che hanno investigato in diversi sistemi cellulari hanno confermato che Parkin ubiquitinizza una serie di proteine che risiedono nei mitocondri, incluse le Mitofusine che promuovono la fusione (Mfn1 e Mfn2). Attraverso analisi dettagliate condotte in insetti e in cellule mammifere, è stato dimostrato che la poliubiquitinizzazione della mitofusina da parte di Parkin segnala il reclutamento del proteosoma e la degradazione delle mitofusine [175].

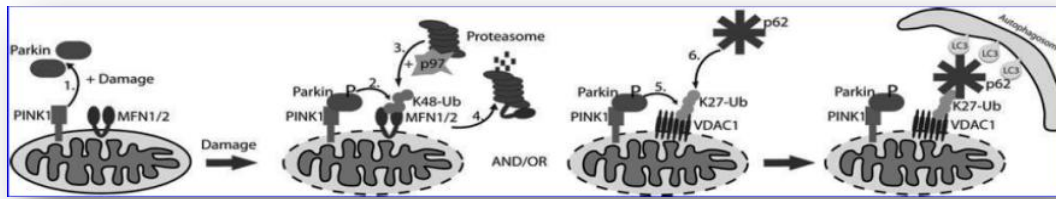


Figura 13: I mitocondri danneggiati inducono la mitofagia. In caso di danno mitocondriale, PINK1 localizza nei mitocondri e recluta E3-ligase Parkin verso i mitocondri. (1) PINK fosforila Parkin che ubiquitina le mitofusine (2) Le mitofusine ubiquitinate vengono degradate dal proteasoma (4) che è reclutato verso i mitocondri insieme a p97 (3). La degradazione delle mitofusine blocca gli eventi di fusione e la mitofagia può essere attivata. Nello stesso momento Parkin può ubiquitinare VDAC1 creando una catena ubiquitinica K27 (5) che recluta p62 (6) Il legame di p62 su VDAC1 nei mitocondri e su ATG8/LC3/GABARAP sul nascente autofagosoma provoca il sequestro dei mitocondri e la rimozione da parte del macchinario autofagico.

La rimozione delle mitofusine è necessaria per un'appropriata induzione della mitofagia e selettiva rimozione dei mitocondri danneggiati perchè i mitocondri che perdono la mitofusina non sono in grado di fondere con i mitocondri sani come sistema di riparazione. Uno squilibrio programmato della morfologia mitocondriale può così avere la funzione di isolare il pool di mitocondri danneggiati per un successivo sequestro selettivo autofagico e degradazione. Geister et al. [176] dimostrano che VDAC1 (voltage dependent anion channel 1) che è localizzato nella membrana esterna mitocondriale è un target di Parkin durante la mitofagia. Mentre avviene l'ubiquitinizzazione della mitofusina, Parkin genera catene Lys27 poliubiquitinate su VDAC1 così il suo ruolo non è quello di reclutare il proteosoma e degradare VDAC1, bensì di attivare il macchinario autofagico grazie all'attacco di p62 recettore dell'autofagia. Il riconoscimento dei substrati poliubiquitinati, in questo caso i mitocondri, si verifica dal legame dell'ubiquitina con il dominio UBA di p62 da un lato e dal motivo LIR (LC3-interacting region) dall'altro che lega LC3/proteine GABARAP che sono essenziali per dare inizio all'autofagia. Così questa interazione genera un ponte tra i mitocondri e gli autofagosomi

formati di recente. [177] In ogni caso il ruolo ed il reclutamento di p62 nella mitofagia è controverso. Laddove il reclutamento di p62 si è visto essere necessario per la mitofagia PINK1/ Parkin indotta, la mitofagia può avvenire anche in assenza di p62 nei mitocondri [178]. Tuttavia questi studi hanno dimostrato che p62 è coinvolto nel raccoglimento mitocondriale, un evento che precede l'inghiottimento dei mitocondri. Inoltre insieme a p62, la formazione di gruppi ubiquitinati è favorita da HDAC6, una proteina ubiquitina-legame che segnala attraverso il rifacimento dell'actina di promuovere sia l'aggregazione dei mitocondri (simile al raggruppamento delle proteine poliubiquitinate) che la fusione autofagosoma-lisosoma [179]. E' importante notare che le differenze tra i meccanismi proposti, riguardo il reclutamento di Parkin, p62, ed altre proteine autofagiche potrebbe esser causato da differenze nello svolgimento degli esperimenti. Ulteriori esperimenti sono infatti richiesti per spiegare questa complessità focalizzandosi in cellule o tessuti differenti i quali potrebbero non solo avere un ordine diverso di eventi ma utilizzare altri componenti per il riconoscimento.

1.8.7 Mitofagia durante i processi di differenziazione

La rimozione dei mitocondri avviene anche durante la crescita di cellule specializzate ed è un processo essenziale per il corretto sviluppo dell'organo o tessuto. Diversamente dalla mitofagia PINK1/Parkin mediata, la mitofagia indotta durante il differenziamento non è un meccanismo di controllo qualità dei mitocondri malati ma un meccanismo interamente o quasi interamente programmato per l'eliminazione della popolazione mitocondriale. Gli studi migliori sulla mitofagia differenziamento- indotta riguardano la rimozione di mitocondri nella differenziazione delle cellule rosse dal sangue. Gli eritrociti maturi nei mammiferi non contengono mitocondri, permettendo loro di massimizzare la loro capacità di trasportare l'ossigeno e di vivere più a lungo in circolo poiché rendono inferiore il rischio di danno indotto dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotto dai

mitocondri. Due gruppi, indipendentemente, hanno identificato la proteina NIX (nota come BNIP3L), la qual localizzata nella membrana mitocondriale esterna, risulta essere coinvolta nella rimozione programmata dei mitocondri nelle cellule rosse del sangue immature (reticolociti) [180] I reticolociti dei topi knockdown per NIX sono incapaci di rimuovere i mitocondri, e viene inibito il differenziamento in eritrociti maturi nonostante il macchinario autofagico rimasto sia intatto. E' interessante osservare che i nei reticolociti NIX^{-/-} i mitocondri si posizionano attorno agli autofagosomi ma non vengono sufficientemente fagocitati e ripuliti. Questo lavoro ha stimolato un'ulteriore investigazione nel ruolo di NIX nella mitofagia, e si è scoperto che NIX interagisce direttamente con Atg8 ossia LC3 analogo nei mammiferi il quale è essenziale per la formazione degli autofagosomi attraverso l'incorporazione nelle membrane appena formate.

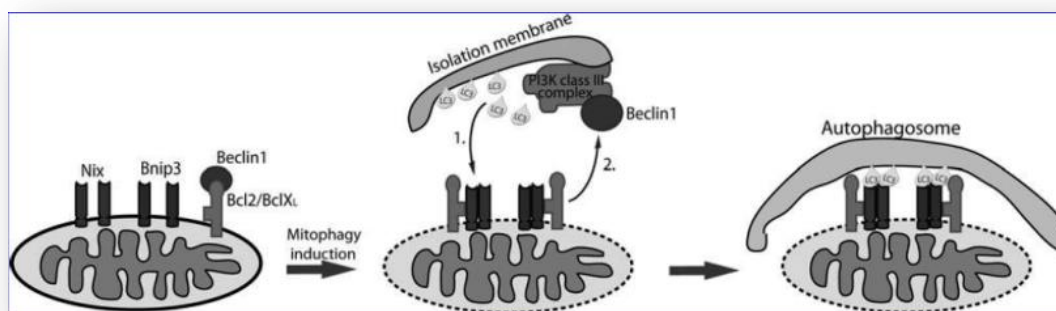


Figura 14: Il differenziamento induce la mitofagia, ruolo dei recettori mitocondriali. Con l'induzione della mitofagia i recettori mitocondriali Nix e BNIP3 reclutano ATG8/LC3/GABARAP mediante il targeting dell'autofagosoma nascente verso i mitocondri. (1) La dimerizzazione dei recettori può incrementare l'interazione di Nix e BNIP3 con ATG8/LC3/GABARAP. Contemporaneamente, l'interazione di Nix e BNIP3 con Bcl-2/Bcl-XL rilascia Beclin1 (legandosi a Bcl-2/Bcl-XL per bloccare l'autofagia). Beclin1 libera attiva il macchinario autofagico di base per formare l'autofagosoma.

L'interazione avviene attraverso la regione che interagisce con LC3 (LIR) nella parte N-terminale di Nix, e il motivo tetrapeptidico WxxL trovato in altri recettori coinvolti nel riconoscimento del cargo autofagico [181]. Questo meccanismo è analogo a come p62 e NBR1 si legano specificatamente agli aggregati proteici poliubiquitinati e mediano la loro rimozione attraverso l'autofagia. [177] L'interazione di Nix: LC3/GABARAP è stato dimostrato essere assai importante per la maturazione dei reticolociti e clearance mitocondriale infatti l'introduzione di Nix wild-type in reticolociti Nix -/- ripristina completamente la mitofagia. Interessante fu osservare che il ripristino dei reticolociti Nix -/- non risultò completo quando fu utilizzato un nix mutato per il legame LC3/GABARAP, suggerendo l'esistenza di ulteriori recettori mitocondriali o modificazioni, e.g., ubiquitinizzazione. Attualmente non sono stati descritti ulteriori recettori della mitofagia ma si pensa che BNIP3, una proteina omologa di Nix, sia implicata nella mitofagia ipossia-indotta. Oltre all'alta similarità nella sequenza con Nix, BNIP3 condivide il pattern di localizzazione mitocondriale così come il motivo LIR, suggerendo che possa essere scritto nella lista dei recettori mitofagici. Inoltre risultati hanno dimostrato che Nix e BNIP3 hanno un ruolo equamente importante nella selezione e rimozione mitocondriale e risultati biochimici suggeriscono che Nix e BNIP3 leghino individualmente le proteine LC3/GABARAP con diversa affinità. ad esempio LC3 si lega con minor affinità e con maggior affinità a BNIP3. Questo spiega una non ridondanza dei due recettori della mitofagia e del loro possibile reclutamento e ulteriore meccanismo regolatorio attraverso la mediazione del legame con LC3/GABARAP.

2 SCOPO

Questo studio si prefigge di ottenere informazioni riguardo il meccanismo della segregazione del mtDNA mutato che avviene nelle patologie mitocondriali. E' noto infatti che nell'uomo le malattie mitocondriali associate a mutazioni eteroplasmiche dipendono per lo più dalla quantità di molecole di mtDNA wild type. Infatti sintomi clinici o difetti della catena respiratoria non sono presenti al di sopra di un valore soglia relativamente basso di mtDNA normale. Gli approcci terapeutici tentano perciò di favorire la proporzione relativa del mtDNA normale, sfavorendo quello mutato. In questo contesto perciò una migliore comprensione delle condizioni e dei meccanismi attraverso i quali le cellule modificano la quantità di mtDNA mutato potrà aiutare a capire la patogenesi delle miopatie mitocondriali e potrebbe avere una ricaduta terapeutica efficace per le patologie associate alle mutazioni eteroplasmiche del mtDNA. Lo studio svolto si prefigge di valutare il contributo del meccanismo di controllo di qualità (mitofagia e dinamica mitocondriale) nella segregazione del mtDNA mutato. A tal fine sono stati utilizzati i ibridi di polmone e muscolo con una diversa percentuale di mutazione A3243G (Mutazione MELAS) del mtDNA, sfruttando la loro caratteristica peculiare di segregare in modo opposto il mtDNA wild type e mutato: i ibridi di polmone favoriscono il mtDNA wild type, mentre quelli di muscolo favoriscono le molecole mtDNA mutate.

A tal scopo sono stati sviluppati i seguenti punti :

A. Influenza della dinamica mitocondriale sulla segregazione:

Studi svolti nel laboratorio dove ho condotto la tesi, hanno dimostrato in che la fusione mitocondriale favorisce il mtDNA mutato in ibridi eteroplasmici di muscolo. Per analizzare l'impatto sulla segregazione della dinamica mitocondriale è stato fatto il silenziamento di mitofusina 1 (MFN1), proteina responsabile della

fusione mitocondriale, in ibridi muscolari con 80% di mtDNA mutato, mediante RNA interference. I cloni ottenuti sono stati caratterizzati a livello morfologico, molecolare e biochimico. Questo esperimento mirava ad aumentare la frammentazione mitocondriale e facilitare quindi la mitofagia con conseguente eliminazione dei mitocondri alterati. Questo esperimento poteva dare informazioni se la dinamica ha un ruolo nella riduzione del mtDNA mutato nei ibridi di muscolo che favoriscono il mtDNA mutato.

B. Caratterizzazione del potenziale autofagico e quantizzazione della mitofagia:

Lo studio svolto si prefiggeva di caratterizzare i ibridi di polmone e muscolo per osservare se queste due tipi cellulari presentano differenze a livello di autofagia generale e/o a livello di mitofagia. I risultati ottenuti potevano indicarci se la mitofagia ha un ruolo importante nella segregazione del mtDNA mutato .

C. Caratterizzazione del potenziale autofagico: mediante valutazione, sia a livello proteico che d'espressione, dei principali geni coinvolti nel processo autofagico quali: LC3 e p62 in ibridi di polmone e di muscolo con diversa percentuale di mutazione, trattati con o senza cloroquina (50µM per 6 ore). Gli autofagosomi sono stati inoltre valutati mediante immunofluorescenza e analisi di immagini.

D. Quantizzazione della mitofagia: mediante analisi (i) molecolare; (ii) morfometrica; (iii) biochimica in ibridi di polmone e di muscolo con diversa percentuale di mutazione, trattati con o senza cloroquina (50µM per 6 ore): (i) Molecolare: valutazione della espressione di proteine coinvolte nella mitofagia quali BNIP3, PINK1 e PARKIN mediante RT-PCR; (ii) Morfometrica: in immagini ottenute al microscopio confocale di cellule colorate sia con anticorpo-

anti LC3 (marker dei autofagosomi–segnale verde) che con mitotrak red (marker dei mitocondri –segnale rosso) è stata quantizzata la mitofagia (colocalizzazione del segnale di LC3 e dei mitocondri) in parallelo alla valutazione degli autofagosomi totali per cellule (LC3) con software dedicato; (iii) Biochimica: quantizzazione della presenza delle proteine BNIP3, PINK e PARKIN, markers di mitofagia localizzati sulla membrana mitocondriale esterna, valutata tramite Western Blotting (WB) in mitocondri isolati delle stesse cellule.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Biologia cellulare

3.1.1 Materiali per colture cellulari

Tutto il lavoro è stato svolto in condizioni di sterilità usando una cappa sterile (SterilGARD®III Advance The Baker Company). Le cellule sono cresciute in un incubatore umidificato CO₂ (Haereus) a 37°C, ed osservate con un microscopio ottico (ZEISS IM35). Utilizzati articoli usa e getta di plastica sterili come (dischi, fiasche, pipette, tubi e puntali con filtro) forniti da Gibco. Le pipette di vetro Pasteur sono state sterilizzate in autoclave per 30 minuti a 121°C ad una pressione di 1 atm.

3.1.2 Linee cellulari

Per gli esperimenti son state utilizzate diverse linee cellulari:

| LINEE CELLULARI | BACKGROUND NUCLEARE | GENOTIPO MITOCONDRIALE | NUMERO UTILIZZATO IN QUESTO LAVORO |
|---|---------------------|--|------------------------------------|
| <i>PARENTAL RD Rho⁺a</i> | Rabdomiosarcoma | Wild-type mtDNA | <i>RD (ρ⁺)</i> |
| <i>RD 0% CYBRIDS</i> | Rabdomiosarcoma | 100% wild-type mtDNA (da fibroblasti di soggetti sani) | <i>WT2-WT4-WT6-WT7</i> |
| <i>RD MELAS 70% CYBRIDS^d</i> | Rabdomiosarcoma | 74% (eteroplasmici) mtDNA MELAS mutato | <i>RD MELAS 70%</i> |
| <i>RD MELAS 80% CYBRIDS^b</i> | Rabdomiosarcoma | 80% (eteroplasmici) mtDNA MELAS mutato (da ibridi di osteosarcoma) | <i>RD MELAS 80%</i> |
| <i>RD MELAS 99% CYBRIDS^b</i> | Rabdomiosarcoma | 99% (omoplasmici) mtDNA MELAS mutato (da paziente MELAS con 55% di fibroblasti mutati) | <i>RD MELAS 99%</i> |

| LINEE CELLULARI | BACKGROUND NUCLEARE | GENOTIPO MITOCONDRIALE | NUMERO UTILIZZATO IN QUESTO LAVORO |
|---|----------------------------|--|---|
| <i>PARENTAL B2 A549</i> | Adenocarcinoma polmonare | Wild-type mtDNA | <i>B2 A549</i> |
| <i>B2 0% CYBRIDS</i> | Adenocarcinoma polmonare | 100% wild-type mtDNA (da ibridi di osteosarcoma) | <i>B2 0% A B2 0% B B2 0% C</i> |
| <i>B2 MELAS 35% CYBRIDS^d</i> | Adenocarcinoma polmonare | 74% (eteroplasmici) mtDNA MELAS mutato | <i>B2 MELAS 35%</i> |
| <i>B2 MELAS 70% CYBRIDS^b</i> | Adenocarcinoma polmonare | 80% (eteroplasmici) mtDNA MELAS mutato (da paziente MELAS con 55% di fibroblasti mutati) | <i>B2 MELAS 70%</i> |
| <i>B2 MELAS 99% CYBRIDS^b</i> | Adenocarcinoma polmonare | 99% (omoplasmici) mtDNA MELAS mutato (da ibridi eteroplasmici) | <i>B2 MELAS 99%</i> |

Cellule Rhabdomyosarcoma (RD Rho⁺) sono state regalate dal Prof Salviati (Dipartimento di scienze biomediche di Padova)

Cibridi RD MELAS eteroplasmici 70%-80%- 99% sono stati costruiti nel nostro laboratorio

RD WT cybrids sono stati regalati dal Prof. J. Poulton (John Radcliff Hospital, Università di Oxford).

B₂ A549; ibridi 0%, B₂ 0% A-B-C, B₂ 35%,70%,99% sono stati regalati dal Dott. Ian Holt

3.1.3 Terreni

3.1.3.1 Terreni per colture cellulari

Ciascun terreno è stato preparato filtrandolo attraverso un filtro sterile 0.22µm cut-off per escludere le contaminazioni batteriche.

Le cellule parentali RD e A549 e relativi ibridi son cresciute in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) contenente 4.5g/litro di glucosio, 110mg/litro piruvato,

arricchito con siero fetale di vitello (FCS) (precedentemente scomplementato raggiungendo una temperatura di 56°C per 30 minuti), penicillina e streptomicina, aminoacidi, L-glutammina e vitamine.

| | MEDIUM |
|---|--------------------------------------|
| DMEM (High glucose 4.5g/l-110mg/ml pyruvate) (Gibco, cat. n. 41966-029) | 90% |
| FCS | 10% (Euroclone, cat. n. ECS0180L) |
| PS^a (Biochrom, cat. n. A2213) | 1X |
| Aminoacids^b (Gibco, Cat. n. 51051-019) | 1X |
| L-glutamine^d (Sigma, cat. n. G-5763) | 0.296mg/ml |
| Vitamins^d (Seromed, Cat. n. K0373) | 1X |

PS (penicillina e streptomicina) fornita in una soluzione 100X. La soluzione 1X ha 100unità/ml di penicillina e 0.1mg/ml di streptomicina. Aminoacidi sono forniti come soluzione 50X (Aminoacidi 50X contengono 6320mg/ml L-arginina, 1200mg/ml L-cisteina, 3625mg/ml, 2100mg/ml L-istidina idroclorato-H₂O, L-Isoleucina, 2260mg/ml L-Leucina, 3625mg/ml L-Lisina, 775mg/ml L-Metionina, 1650mg/ml L-fenilalanina, 2380mg/ml L-treonina, 510mg/ml L-Triptofano, 1880mg/ml L-Tirosina e 2340mg/ml L-Valina preparate in acqua distillata). Vitamine fornite in una soluzione 100X (Vitamine 100X contenenti 100mg/ml Colina cloridrato, 100mg/ml D-Calcio pentotenato, 100mg/ml Acido Folico, 200mg/ml i-Inositolo, 100mg/ml Nicotinamide, 100mg/ml Pyridoxal hydrochloride, 10mg/ml Riboflavina, 100mg/ml Thiamine hydrochloride and 8500mg/ml sodio cloridrato). La soluzione di L-glutammina è stata preparata sciogliendo 29.6mg di L-glutammina in 1ml di acqua sterile.

3.1.3.2 Dialisi del FCS

La dialisi del siero scomplementato è fatta per rimuovere l'uridinache favorisce la crescita delle cellule ρ^0 . 500ml di FCS vengono versati all'interno di una membrana Spectra/Por[®] 3 (Spectrum Lab. Inc. cat.132720) con un cut-off di 3500 Da e successivamente dializzati per dieci cicli di 1 ora ciascuno a 4°C immersi in 5 litri di buffer per dialisi 1X preparato diluendo 1:10 la soluzione madre 10X (1.5M NaCl, 50mM KCl, 250mM Tris, pH 7.4) in agitazione costante. Dopo tale procedura l'FCS è stato aliquotato in Falcon da 50mL e stoccato a -20°C.

La seguente tabella riporta il principale terreno utilizzato per la crescita dei cibridi:

| | CYBRIDS MEDIUM |
|--|-----------------------|
| DMEM (high glucose 4.5 g/l-110 mg/ml pyruvate) (Gibco, cat. n. 41966-029) | 85% |
| FCS dializzato (Gibco, cat. n. ECS0180L) | 15% |
| PS (Biochrom, cat. n. A2213) | 1X |
| Amfotericina B (Bristol-Myers-Squibb, 50mg/ml Cat. n. J02AA01) | 3.33µg/ml |
| Aminoacids (Gibco, n. 51051-019) | 1X |
| L-glutammina (Sigma, cat. n. G-5763) | 0.296mg/ml |
| Vitamin (Seromed, Cat. n. K0373) | 1.5X |

3.1.4 Procedure di coltura

3.1.4.1 Cellule proliferanti

Cibridi RD e cibridi A549 sono stati splittati ogni 2 giorni utilizzando tripsina-EDTA (Biochrom AG, Cat. n. L2153) mantenendole così ad una bassa confluenza. Sono state seminate ad una confluenza del 30-40%.

3.1.4.2 Cellule per valutazione dell'autofagia

Per poter analizzare l'autofagia nelle varie linee cellulari, le cellule sono state piastrate in accordo con la tabella sotto riportata. Indispensabile è evitare che cellule non risultino eccessivamente affollate o mal distribuite sulla superficie della piastra. Tutti i cibridi sono stati piastrati in doppio.

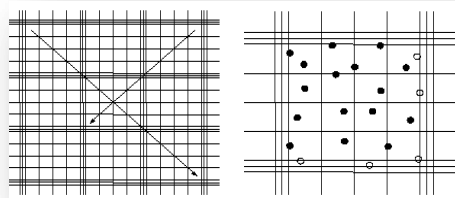
| Cellule per disco 60Ø | Cellule per disco 100Ø | Cellule per disco 150Ø | Cellule per disco Ø well 16 Vetrino Ø 13mm |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|
| Raccolta TRIZOL (RNA) | Raccolta PELLET (WB) | Raccolta MITO ISO | COLORAZIONE |
| 350.000 | 750.000 | 1500000-1750000 | 70.000 |

3.1.4.3 Flusso autofagico

Per la valutazione del flusso autofagico nel giorno successivo alla semina è stato cambiato il terreno di crescita in tutte le piastre e aggiunta, solo in uno dei due dischi, Clorochina ad una concentrazione 50µM per 6 ore. Al termine di queste ore è avvenuta la raccolta delle cellule, trattate (CLQ) e non (CTR).

3.1.5 Conta cellulare

La conta delle cellule è stata fatta utilizzando la camera di Burker.



20µl, della soluzione cellulare ottenuta risospesando le cellule in un dato volume di PBS, sono caricate nella camera di Burker. Generalmente vengono contate le cellule che si trovano in 5 dei 9 quadranti comprese le cellule che si trovano nella metà delle linee alla periferia. La media delle cellule contate viene quindi divisa per 64. Poi il valore ottenuto corrisponde ai milioni di cellule in 1ml. Il valore viene moltiplicato per il volume effettivo in cui sono risospese le cellule.

i.e. cellule risospese in 10ml di PBS;

cellule per quadrante: 30, 35, 29, 32, 34; Media: 32

$32/64=0.5$ $0.5 \times 10^6 = 500.000$ cellule/ml

$500.000 \text{ cells} \times 10\text{ml} = 5.000.000$ cellule totali

3.1.6 Batteri

3.1.6.1 Coltura batterica

I batteri utilizzati in questo lavoro son stati TOP 10 batteri competenti.

I batteri son cresciuti in un terreno liquido Luria Bertani (LB) (Bacto-tryptone 10g/l, extract Bacto yeast 5g/l, Ampicilin 100mg/l pH7) e in una piastra di agar (150g agar/l media) a 37°C.

L'inoculazione batterica e la semina è stata fatta in condizioni semi-sterili, utilizzando il Bunsen. Sono stati conservati stock di diversi batteri a -70°C in 15% glicerolo.

3.1.6.2 Trasformazione batterica tramite shock termico

I batteri competenti sono stati sgelati in ghiaccio a 4°C. 1-2µl di DNA sono stati aggiunti a 50µl di batteri competenti. Lo shock termico è stato ottenuto grazie alle differenti temperature così raggiunte: 20 minuti in ghiaccio a 4°C, 45 secondi a 42°C, 2 minuti in ghiaccio a 4°C. Successivamente, sono stati aggiunti 500µl di LB e la mix è stata tenuta in agitazione a 37°C per 1 ora. Dopo l'agitazione, 100µl della mix sono stati piastrati su agar utilizzando uno scrape e la piastra è stata incubata tutta la notte a 37°C.

3.1.7 Transfezione

Cibridi eteroplasmici derivati da cellule muscolari (rabdomyosarcoma) contenenti il 80% di mtDNA mutato sono state trasfettate con vettori di clonaggio plasmidici quali: HuSH shRNA Plasmid pRS e pRS MFN1- RNAi, acquistati dalla ditta Origene Technologies.

Siamo partiti da un set di costrutti shRNA contenente:

4 vials di vettori d'espressione gene-specifici shRNA in Plasmide pRS (5µg/vial), questi vettori in grado di down-regolare Mfn1 si differenziavano tra loro per la sequenza:

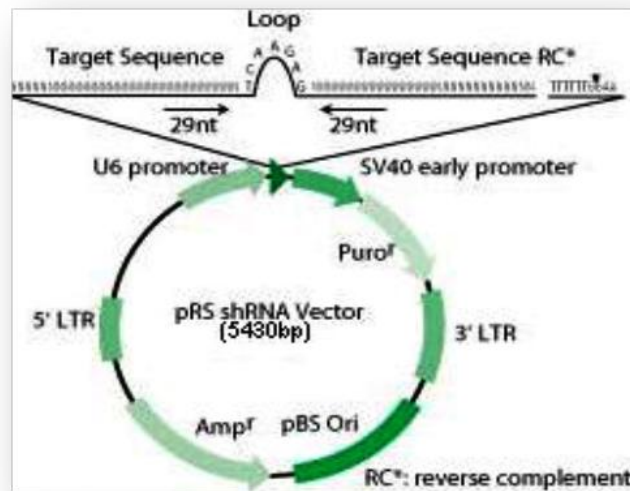
Vettore 1 TTGTGCTGGCTAAGAAGGCGATTACTGCA

Vettore 2 CCTAAGTGTTGAAGGAACTGATGGAGATA

Vettore 3 AAGGTGAATGAGCGGCTTTCCAAGCCTAA

Vettore 4 ACATAATGGATTCAGTAAACCTGGCAGCT

1 vial di controllo negativo shRNA non efficace in Plasmide pRS (5µg/vial)



Sono stati piastrati tutti e 4 i vettori in grado di silenziare Mitofusina1 e il vettore di controllo, dopo il trattamento in puromicina, che permette la selezione delle cellule trasfettate in quanto il plasmide se integrato conferisce alla cellula resistenza, un pool di cellule appartenente ad ogni vettore è stato raccolto e su di esso è stata calcolata l'espressione genica della proteina Mfn1 con RT-PCR. (guarda paragrafo 3.2.11)

Il valore d'espressione dei vettori N° 1-2-3-4 è stato rapportato al valore del vettore trasfettato con il plasmide vuoto. Il vettore scelto per i nostri esperimenti è stato il vettore n°1 il quale aveva un'espressione genica inferiore agli altri, esso era stato down regolato del 20%.

Una volta scelto il vettore 1 insieme al vettore di controllo è stata fatta una diluizione cellulare in modo da far cadere una singola cellula in un pozzetto di una well da 96 pozzetti. Dopo 5gg è stato possibile osservare che in qualche pozzetto stava crescendo un clone di cellule. Man mano che le cellule erano affollate nel pozzetto dove si trovavano venivano splittate in un pozzetto dal diametro maggiore permettendo così la loro crescita; quindi le cellule venivano trasferite dalle piastre da 96 pozzetti, a quelle da 24 pozzetti, poi quelle da 12 pozzetti in fine nei dichi da 60mm e 100mm. In questo modo abbiamo

ottenuto 11 cloni down regolati per Mfn1 e 21 cloni di controllo. In seguito alla quantizzazione proteica con western blot abbiamo scelto per i nostri esperimenti 6 cloni down regolati per Mfn1 e 6 cloni di controllo.

La trasfezione è stata ottenuta utilizzando Lipofectamine™ 2000 dell' Invitrogen (Cat.No. 11668-027). Nel giorno antecedente alla trasfezione sono state piastrate 10^5 cellule in un pozzetto di piastre da 6 pozzetti ciascuna, utilizzando 2ml di terreno di crescita per pozzetto in modo da raggiungere una confluenza del 90-95% al momento della trasfezione. I complessi che compongono DNA-Lipofectamine™ 2000 sono stati preparati secondo la seguente modalità: 2µg di DNA son stati diluiti in 250µl di DMEM e 5µl di Lipofectamine™ 2000 son stati diluiti in 250µl di DMEM. La soluzione ottenuta miscelando le due è stata incubata per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo tale incubazione, il DNA diluito è stato aggiunto alla soluzione Lipofectamine™ 2000 (raggiungendo un volume totale di 500µl). La miscela è stata agitata dolcemente ed incubata per 20 minuti a temperatura ambiente, permettendo ai complessi DNA-Lipofectamine™ 2000 di formarsi. Dopo rimozione del medium 500µl dei complessi DNA-Lipofectamine™ 2000 e 2ml di DMEM son stati aggiunti a ciascun pozzetto contenente cellule. Il terreno è stato cambiato dopo 4-6 ore. 24 ore dopo la trasfezione le cellule son state trasferite in piastre da 60mm e il giorno seguente son state messe in selezione aggiungendo il terreno selettivo con 0.5mg/ml puromicina.

3.2 Biologia molecolare

3.2.1 Estrazione DNA da cellule

Materiali:

75mM NaCl + 50mM EDTA (pH=8.0) soluzione

0.5% SDS soluzione (25µl per ml partendo dalla soluzione madre al 20%)

10mg/ml Proteinase K, recombinant, PCR grade (Roche, cat. n. 0.115836001. Aliquots stored at -20°C)

Isopropanolo

70% Etanolo

TE soluzione pH=8.0: 10mM Tris-HCl and 1mM EDTA

Tutte le soluzioni sterilizzate con camera filtrante con cut-off di 0.22 µm. Per estrarre il DNA, la soluzione cellulare è stata raccolta in Eppendorfs sterili e centrifugata per 5 minuti a 1000g. Il surnatante è stato rimosso. Quindi aggiunti 500µl della soluzione NaCl-EDTA, 25µl di SDS 20% e 10µl di proteinasi K 10mg/ml. Con pipette sterili la sospensione è stata risospesa finchè è diventata viscosa e quindi lasciata tutta la notte a 37°C (bagno o incubatore).

Il giorno successivo, alla sospensione vengono aggiunti 500µl di isopropanolo quindi mescolata per inversione fino a vedere una sorta di medusa. Le eppendorfs vengono quindi centrifugate per un 1 minuto a 13000 rpm e rimosso il surnatante. Il pellet ottenuto è stato lavato con 500µl di etanolo al 70% e centrifugato ancora per 1 minute a 13000 rpm. L'etanolo è stato rimosso ed il pellet lasciato ad asciugare all'aria a temperatura ambiente per qualche ora.

Il DNA è stato quindi risospeso, rispetto alla sua quantità, in un volume adeguato di TE buffer (o acqua) e incubato per 30 minuti a 37°C. I campioni sono stati conservati a -20°C fino al loro uso.

3.2.2 Misura della concentrazione del DNA

La concentrazione del DNA è misurata con lo spettrofotometro a 260nm. Tale valore si ottiene moltiplicando il fattore di conversione OD₂₆₀ per il fattore di diluizione 50µl/ml. Il rapporto OD_{260nm}/OD_{280nm} indica la purezza della preparazione di DNA. Quando il rapporto si trova in un range di valori compresi tra 1.7 e 2, il DNA non ha contaminazioni proteiche.

3.2.3 PCR

Materiali:

- Acqua sterile
- GeneAmp 10X PCR Buffer II (Sigma, cat. n. N808-0010)
- GeneAmp 25mM MgCl₂ buffer (provided with 10X PCR Buffer II)
- 5U/µl AmpliTaq GOLD (provided with 10X PCR Buffer II)
- 2mM dNTP (preparato da una soluzione madre 100mM soluzione stock di dATP, dCTP, dGTP, dTTP diluiti con acqua sterile)
- Forward (F) and Reverse (R) 10µM primers (Sigma, from 100µM stock solutions)
- Provette sterili per PCR (Eppendorf)
- Puntali per pipette sterili

Polymerase Chain Reaction (PCR), originariamente inventata da Kerry Mullis, mira ad amplificare sequenze specifiche di DNA partendo dal DNA complessato com'è il DNA genomico. Per amplificare la sequenza, due oligonucleotidi complementari (primers)

sono attaccati all'estremità -3' del DNA denaturato utilizzando condizioni di ibridizzazione che assicurano la massima specificità di legame (allineamento). Successivamente i primers sono allungati da una polimerasi termostabile TAQ, un enzima isolato da *Thermus Aquaticus*, un batterio che vive in cavità termali o nelle calde sorgenti a 90-100°C. Questi enzimi usano dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) per allungare il filamento di DNA copiato.

Utilizzando la polimerasi AmpliTaq GOLD DNA è necessaria un passaggio di pre-PCR a 95° in modo da attivare l'enzima. Poi vengono ripetuti tre passaggi per un numero di cicli che dipendono dal campione, scelti enzima e primers. I passaggi sono denaturazione, allineamento ed estensione.

La temperatura di allineamento (Ta) dipende dai primers scelti. Essa può esser stimata con la formula seguente:

$$T_a = 69.3 + (0.41 \times \%GC) - 650/n$$

n = numero di nucleotidi

Un tipico protocollo usato per la mix di un campione è riportato nello schema seguente

| PCR | |
|-------------------------|--------------|
| Acqua sterile | 7.7 µl |
| 10X PCR Buffer II | 2 µl |
| 50 mM MgCl ₂ | 1.2 µl |
| 2mM dNTP | 2 µl |
| 10 µM F primers | 1 µl |
| 10 µM R primers | 1 µl |
| AmpliTaq GOLD 5U/µl | 0.1 µl |
| DNA | 5 µl |
| Volume finale | 20 µl |

Tutti i reagenti di PCR sono stoccati a -20°C , scongelati esclusivamente prima dell'uso e tenuti in ghiaccio durante l'esperimento. L'intera procedura dev'esser fatta mantenendo la sterilità per evitare la contaminazione dei prodotti di PCR. Per osservare possibili contaminazioni in ciascuna PCR viene incluso un controllo negativo che non contiene DNA.

3.2.3.1 PCR per polimorfismi nucleari

Per verificare se i ibridi RD o A549 avevano un background nucleare, è stato amplificato un locus polimorfico D11S533 nel cromosoma 11 con PCR. La sequenza dei primers è:

Senso 5' - GGT GTG GTC AAT CGC TTT CT -3'

Non senso 3' - CAT GTC CCC AGT GGATAA GG -3'

PCR PROGRAM:

- Attivazione Taq GOLD 95°C 10'
- 3 passaggi per 40 cycles:
 - Denaturazione 95°C 30''
 - Allineamento 60°C 30''
 - Polimerizzazione 72°C 30''
- Elongazione 72°C 7'
- Stop 4°C ∞

I controlli positivi son rappresentati da RD MELAS.

3.2.3.2 Amplificazione del gene mitocondriale con PCR

Con lo scopo di verificare la presenza dell' mtDNA o la percentuale di DNA mitocondriale mutato, la regione 3033-3361 bp dell' mtDNA contenente il sito di mutazione puntiforme A3243G causa della sindrome MELAS è stato amplificato usando primers con la seguente sequenza:

Senso 5'- GTT CGT TTG TTC AAC GAT T -3'

Non senso 3'- GCC ATT GCC ATT AGA ATG G -5'

PROGRAMMA PCR :

- Attivazione Taq GOLD 95°C 10'
- 3 passaggi per 40 cicli:
 - Denaturazione 95°C 30''
 - Allineamento 50°C 1'
 - Polimerizzazione 72°C 2'
- Elongazione 72°C 7'
- Stop 4°C ∞

In questo caso WT7, RD MELAS 99% sono stati utilizzati come controlli.

3.2.4 Digestione con Apa I

MATERIALI:

- Acqua sterile
- Tubi sterili e puntali sterili (Eppendorf)
- APA I KIT (Invitrogen, cat. n. 15440-019, stored at -20°C) contiene:
 - React[®] 4 10X buffer: buffer concentrato per il saggio con 200µg/ml BSA aggiunto per esser diluito 1 parte in 10 per soluzione di reazione finale.
 - 10U/µl APA I

Per verificare la presenza della mutazione A3243G, è stato utilizzato il DNA amplificato dalla PCR MELAS.



Tale punto di mutazione introduce un sito di restrizione per APAI nell'amplificato dell' mtDNA (328 bp). APAI taglia la sequenza GGGCCC generando due frammenti di 214 and 114 bp. La digestione avviene tutta la notte a 25°C.

La soluzione usata per ciascun campione è stata:

| APA I DIGESTION MIX | |
|---------------------------------|--------------|
| Acqua sterile | 3.8 µl |
| REact [®] 4 10X buffer | 1 µl |
| APA I | 0.2 µl |
| CAMPIONE | 5 µl |
| Volume finale | 10 µl |

3.2.5 Elettroferesi in gel d'agarosio

MATERIALI:

- Soluzione d'agarosio al 2% (Invitrogen cat. n. 15510-027)
- Soluzione 1X TAE: 40mM Tris-acetato, 1mM EDTA
- 6X Loading Dye: 0.25% Blu di bromofenolo, 0.25% Xylen cyanol FF, 30% glicerolo
- Syber Green concentrazione finale 0.5µg/ml

Agarosio è un polimero lineare utile per separare il frammenti di DNA di diversa grandezza. Esso genera una matrice con densità variabile in relazione alla concentrazione

della soluzione iniziale. Successivamente il DNA migrerà differientemente a seconda della sua dimensione e conformazione spaziale.

Generalmente, il DNA viene rivelato grazie al Syber Green I Dye che rivela i prodotti della reazione di polimerizzazione a catena legando i doppi filamenti di DNA formati durante la PCR. Mentre la PCR procede vengono creati molti ampliconi. Fino a quando il Syber Green I Dye si è legato tutto al doppio filamento di DNA, il risultato è un incremento di fluorescenza proporzionale alla quantità dei prodotti di PCR prodotti. Per colare il gel, la polvere di agarosio è miscelata con il buffer d' elettroforesi (1X TAE) raggiungendo la concentrazione desiderata, quindi scaldato nel forno microonde fino a che non risulta completamente sciolto. La soluzione è colata all'interno di una vaschetta che contiene un pettine dove verrà posto il campione quindi si aspetta il tempo necessario affinché solidifichi a temperatura ambiente.

Dopo che il gel ha solidificato, il pettine viene rimosso, facendo attenzione a non rovinare il fondo del pozzetto. Il gel, ancora all'interno della cassetta di plastica, è inserito orizzontalmente nella camera di elettroforesi e coperto con TAE 1X.

I campioni che contengono DNA miscelato con 6X buffer di caricamento vengono quindi pipettati all'interno del pozzetto, il coperchio con gli elettrodi son posti sopra all'apparecchio, e la corrente è accesa a 80-90V. La distanza assunta dal DNA migrato nel gel può essere determinata attraverso il monitoraggio visivo della migrazione delle colorazioni.

Per visualizzare il DNA il gel viene posto sopra al transilluminatore ultravioletto, e così viene catturata un'immagine digitale utilizzando il seguente strumento: IMAGE MASTER TOTAL LAB PRO.

3.2.6 Last Cycle Hot PCR (LC-PCR) and phosphor-imaging

3.2.6.1 LC-PCR

LC-PCR permette di quantificare le bande di restizione con un'eccellente sensibilità seguendo un normale protocollo di PCR modificato dall'aggiunta di un passaggio radioattivo. Infatti, la mix per PCR è la stessa già illustrata nel paragrafo 3.3.3, ma il programma inserisce una pausa in corrispondenza dell'ultimo passaggio di allineamento per inserire il materiale radioattivo nella mix di reazione.

Il materiale radioattivo utilizzato è stato citidina 5'-[α - 32 P] trifosfato (GE Healthcare, cat. n°AA0005. 9.25 MBq/ml, 250 μ Ci, 25 μ l).

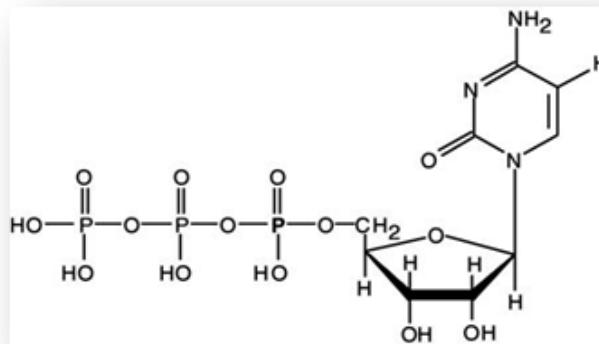


Figura 14: struttura chimica della citidina 5'-[α - 32 P] trifosfato (32P-dCTP)

Questo protocollo è stato utilizzato per quantificare le bande di restrizione di APA I, il programma di PCR è stato quindi simile al programma standar di PCR per il gene MELAS:

PROGRAMMA PCR:

- Attivazione Taq GOLD 95°C 10'
- 3 passaggi per 39 cicli:
 - Denaturazione 95°C 30''
 - Allineamento 50°C 1'
 - Polimerizzazione 72°C 2'
- Ciclo singolo radioattivo:
 - Denaturazione 95°C 30''
 - Pausa a 50°C
 - Aggiunta di 1 µl della soluzione radioattiva diluita in ciascun tubo
 - Allineamento 50°C 1'
 - Polimerizzazione 72°C 2'
- Elongazione 72°C 7'
- Stop 4°C ∞

La radioattività del ³²P decade in 26 giorni, per questa ragione i primi esperimenti sono stati fatti con una soluzione diluita 1:20 mentre, dopo una settimana è stata utilizzata una soluzione diluita 1:10.

Quando la PCR è stata completata, la digestione con Apa I è stata realizzata incubando la mix a 25°C per almeno 4 ore utilizzando la stessa macchina per la PCR. La digestione di Apa I è stata disegnata in accordo con il protocollo descritto nel paragrafo 3.3.4, ma utilizzando un volume finale di 20µl al posto di 10µl.

3.2.6.2 Gel d'acrilammide per elettroforesi

MATERIALI:

- 10X TBE: 108g di tris idrossimetil aminometano, 55g di acido borico, 40ml of 0.5M EDTA pH 8. Raggiungendo 1L con acqua milliQ
- 10% Soluzione d'acrilammide: 16.67ml di acrilamide/bis-acrilamide 29:1 (30%) soluzione (Sigma, cat. n. A3574), 5ml di 10X TBE, 28.3ml di acqua milliQ.
- 10% Soluzione ammonio persolfato (APS)
- TEMED (Bio-Rad, cat. n. 161 0801)
- Strumento Biorad mini per elettroforesi
- 6X loading dye

Le lastre di vetro e gli spaziatori da 0.75mm sono stati lavati completamente. Le lastre poi son state sciacquate con acqua deionizzata ed etanolo. Le lastre di vetro devono essere prive di ogni traccia di sporco per prevenire la comparsa di bolle d'aria nel gel. Quindi sono state assemblate insieme agli spaziatori nella struttura per i gel. Per un singolo minigel da 6ml di acrilammide al 10% è stata preparata una soluzione, aggiunta poco prima di colare il gel, con 24µl di APS 10% e 12µl di TEMED. La soluzione viene velocemente versata con una pipetta nella struttura che tiene i gel avendo l'accortezza di non formare bolle. Successivamente viene inserito l' apposito pettine ed il gel viene lasciato a polimerizzare per un'ora (una piccola aliquota della soluzione viene lasciata in una falcon per controllare la polimerizzazione). Dopo che il gel ha polimerizzato i vetri vengono posizionati nell'apparecchio elettroforetico riempito con un buffer di TBE 1X. I pozzetti sono risciacquati utilizzando una siringa anch'essa riempita di TBE 1X. I campioni di DNA vengono preparati per la corsa elettroforetica aggiungendo 10µl di colorante di caricamento 6X per ottenere 20µl di prodotto di PCR. In ciascun gel, sono stati caricati i campioni di controllo: DNA RD MELAS 99% e WT7 0% MELAS. Sono stati caricati 15 µl di soluzione in ciascun pozzetto utilizzando una micropipetta con il puntale in plastica estraibile. Quindi è stata chiusa la cameretta elettroforetica e gli

elettrodi son stati connessi ad un alimentatore di corrente. La corsa avviene a 100V per un'ora e mezza, fino a quando il colorante di caricamento raggiunge la fine del gel.

3.2.6.3 Determinazione delle bande con phosphor-imaging

Dopo la corsa, i minigel al 10% d'acrilammide sono stati essiccati tra due fogli di plastica Amersham utilizzando un essiccatore di gel a 55°C per un'ora. Successivamente i gel essiccati son stati posti in celle camere per phosphor-imaging in modo da poter imprimere le lastre (precedentemente cancellate con l'apposita lampada) per tempi diversi (e.g. 30 minuti, 1, 2 or 3 ore and tutta la notte). Le lastre phosphor-imaging son state poi scannerizzate con il sistema di scanner phosphor-image Amersham.

Le immagini ottenute son state poi analizzate da Gel-Pro Analyzer 4 in modo da poter quantificare l'intensità delle bande ottenendo così la percentuale di mutazione MELAS.

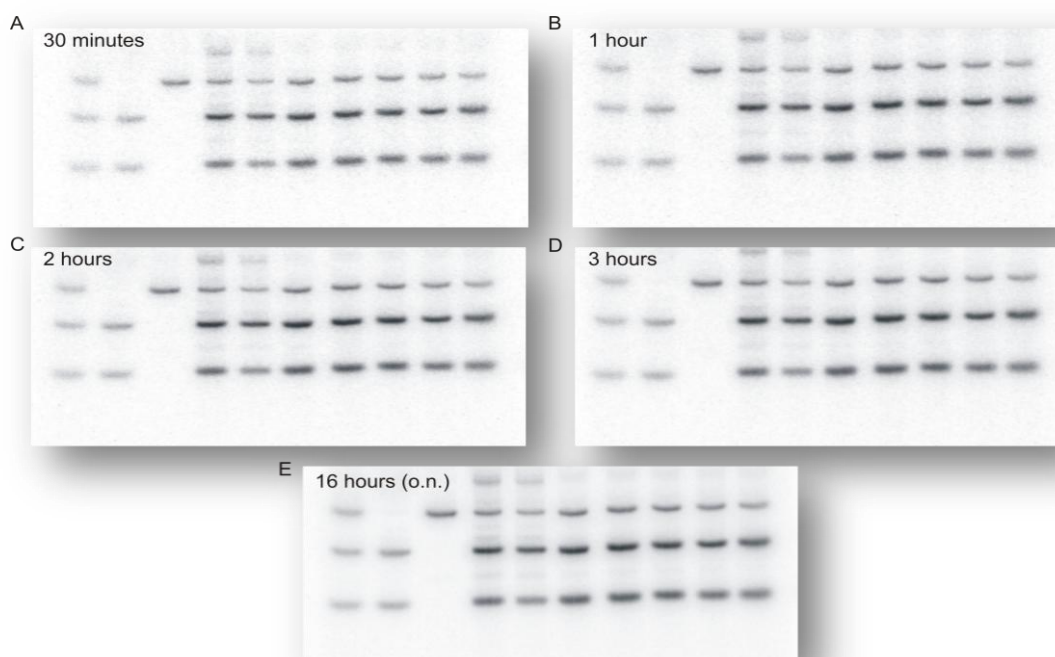


Figura 15:hospor imaging dello stesso podotto di LC-PCR a diversi tempi d'esposizione

3.2.7 Analisi molecolare delle cellule

3.2.7.1 Polimorfismi nucleari

Per stimare il background nucleare dei cibridi RD e quantificare la contaminazione delle cellule d'osteosarcoma è stata amplificata la regione polimorfica nucleare D11S533 nel cromosoma 11. E' stata creata una curva standard mescolando differenti percentuali di DNA proveniente dalle RD e 206 amplificandole con PCR (guarda paragrafo 3.3.3.1) Le bande relative alle cellule parentali RD mostrano una banda a 500bp diverse dalle cellule di osteosarcoma (206) che hanno una banda a 450bp.

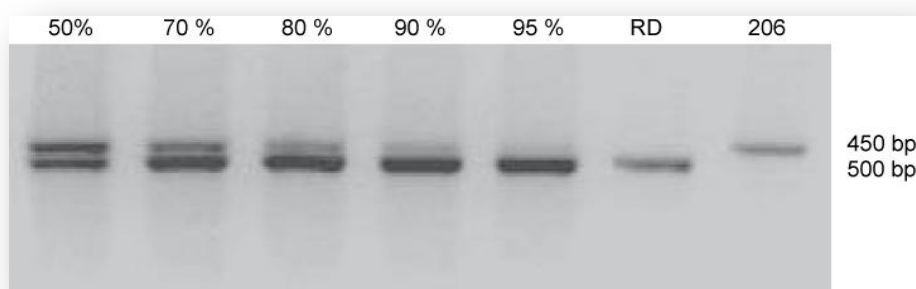


Figura 16: il DNA delle RD MELAS e 206 MELAS è stato mescolato e amplificato con PCR (guardare paragrafo 3.3.3.1) per ottenere una curva standard dei polimorfismi nucleari. Il background nucleare corrisponde alla banda a 500bp (la più bassa), mentre il DNA amplificato dalle 206 mostra una banda a 450bp (la più alta). I valori mostrati rappresentano la % d'abbondanza del DNA nucleare delle RD rispetto a quello delle 206..

3.2.7.2 Rilevazione e quantificazione della mutazione MELAS

Per rivelare e quantificare la mutazione puntiforme MELAS nell'mt DNA delle cellule, i prodotti di PCR (guarda 3.3.3.2) sono stati digeriti con Apa I (see 3.3.4) e fatti correre in un gel d'agarosio al 2% con Syber Green. Le bande son state analizzate utilizzando programmi specifici (ImageJ, TotalLab, Gel-Pro Analyzer 4).

Heteroduplexes di mtDNA mutato o wild-type, formati durante l'ultimo passaggio d'amplificazione di PCR, dovrebbero essere resistenti alla digestione con APA I.

Per correggere questa possibilità, è stata costruita una curva standard con un mix di template ottenuti dall'amplificazione di un campione di DNA contenente ~99% di mtDNA mutato, e l'altro contenente 100% mtDNA wild-type. Sono state preparate miscele con diversi rapporti di mtDNA wild-type e mutato.

La figura 3.4 compara i template mescolati della curva standar (T) così costruiti con i prodotti mischiati nella curva standard (P), ottenuti mescolando i prodotti di PCR indipendentemente amplificati da RD MELAS 99%-derivati e WT7-derivati prodotti in quantità diverse e successivamente le miscele sottoposte alla digestione con Apa I [26].

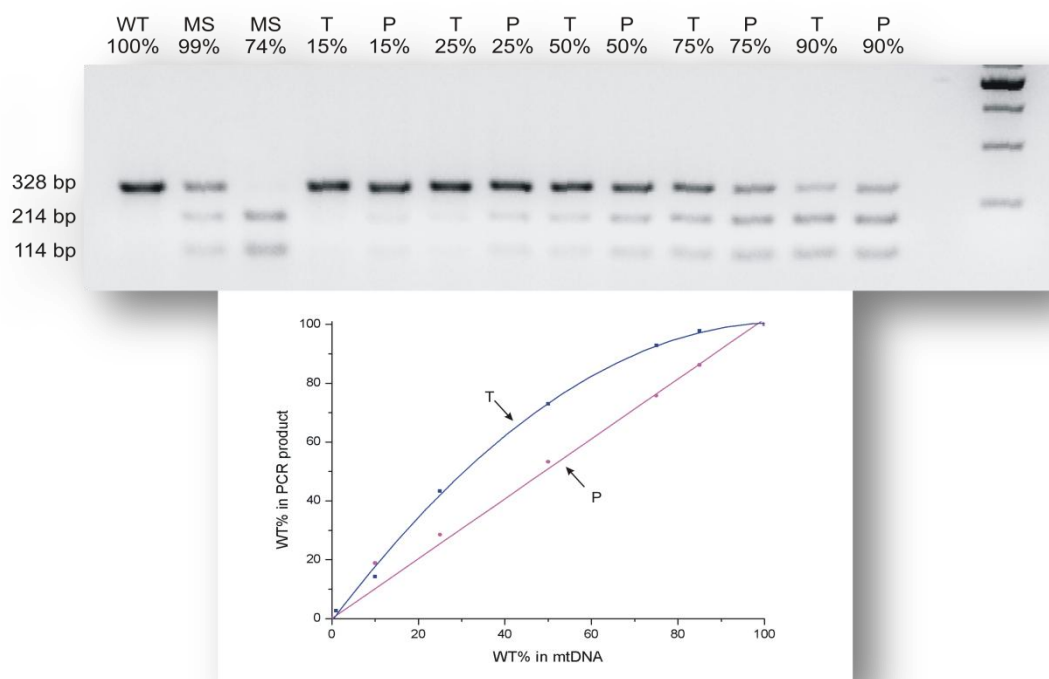


Figura 17:costruzione della curva standard MELAS con EtBr, da curve standard per la quantificazione della mutazione MELAS nell'mtDNA. A) PCR MELAS e restrizione con enzima APA I. Il prodotto è stato fatto correre in un gel d'agarosio al 2% e colorato con EtBr. MS sta per MELAS. Per ciascun campione la % di WT è data. B) Curve: T, la curva standard insieme dei template; P, curva standard insieme dei prodotti. L'equazione della curva T è $y = -0.0091x^2 + 1.9146x$ e $R^2 = 0.9985$. MS: MELAS.

Il rapporto d'eteroplasmia è stato calcolato considerando l'intensità delle bande 328 bp (B_{328}) e 214 bp (B_{214}) di ciascun campione. Un fattore di correzione (CF), calcolato come $B_{328}(WT)/B_{214}(MS)$, è stato aggiunto per normalizzare l'intensità delle bande e l'intensità di WT B_{328} .

La % WT è stata ottenuta come segue:

$$WT\% = \frac{B_{328}}{B_{328} + (B_{214} \times CF)} \times 100$$

Successivamente WT% è stata disegnata ottenendo le curve di Figura 3.4 (B). L'equazione della curva T è stata poi usata per correggere tutta l'equazione poi ottenuta. La % d'eteroplasmia è stata calcolata come $100-WT\%$. La quantificazione della percentuale della mutazione MELAS attraverso LC-PCR è stata fatta seguendo la stessa procedura descritta nel metodo precedente. Nell'ultimo ciclo della Hot-PCR non ci son problemi di digestione dati dalla presenza di heteroduplexes [162], così la costruzione della curva standard è stata reale dell'mtDNA tagliato o non tagliato.

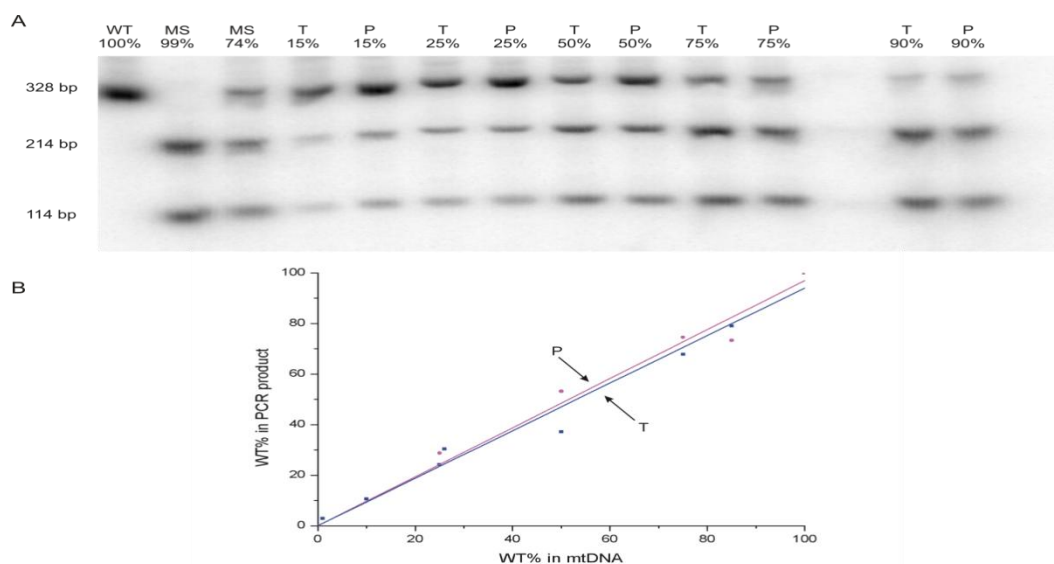


Figura 18: curva standard MELAS con LC-PCR. Costruzione delle curve standard per la quantificazione della percentuale di mutazione MELAS nell'mtDNA. La procedura utilizzata è la stessa della figura 3.4. L'equazione della curva T è $y = 0.9405x$ e $R^2 = 0.9906$; l'equazione della curva P è $y = 0.9699x$ e $R^2 = 0.9903$.

L'equazione della curva standard T mostrata in figura 3.5 conferma l'affermazione precedente, poichè le curve T e P sono quasi identiche, soprattutto il range con all'interno WT% che abbiamo considerato va da 0% al 50%. Di conseguenza, il calcolo

della percentuale di mutazione è stata calcolata senza correggere i valori finali con l'equazione della curva T.

3.2.8 Estrazione RNA

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita utilizzando TRIzol Reagent (Invitrogen, life technologies). Le cellule sono state lisate direttamente nel disco di coltura aggiungendo 0.5ml di TRIzol per un disco di 6cm di diametro.

SEPARAZIONE DI FASE: i campioni omogenati sono incubati per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Sono stati quindi aggiunti 0.1ml di cloroformio per 0.5ml di TRIzol. Le eppendorfs sono state agitate vigorosamente con le mani per 15 secondi e incubati per 2-3 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi centrifugati a 12000g per 15 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione, la soluzione risulta divisa in due fasi: la più bassa rossa, fase di fenol-cloroformio, un'interfase e una fase acquosa incolore nella parte superiore. L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa. Il volume di tale fase acquosa è circa il 60% del volume di Trizol utilizzato per l'omogenizzazione.

PRECIPITAZIONE DELL'RNA: la fase acquosa è trasferita in una nuova eppendorf e l'RNA viene precipitato dalla soluzione acquosa in seguito all'unione con isopropanolo. 0.25ml di isopropanolo sono stati aggiunti per 0.5ml di Trizol utilizzati per l'omogenizzazione iniziale. I campioni sono incubati per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugati a 12000g per 10 minuti a 4°C.

LAVAGGIO DELL'RNA: il surnatante è rimosso e il pellet di RNA è lavato aggiungendo 0.5ml di etanolo al 75%. I campioni vengono vortexati e centrifugati a 7500g per 5 minuti a 4°C. Risospensione dell'RNA: il pellet dell' RNA viene asciugato all'aria a temperatura, quindi risospeso in acqua RNase-free e conservato a -70°C.

La concentrazione di RNA è misurata con lo spettrofotometro a 260nm. E' ottenuta moltiplicando OD₂₆₀ per il fattore di conversione 40µl/ml per il fattore di diluizione. La purezza della soluzione di RNA ottenuta è calcolata com'è scritto per il DNA (guarda paragrafo 3.3.2).

3.2.10 Trascrizione inversa

La sintesi del primo filamento di cDNA è stata ottenuta utilizzando SuperScript™ II Reverse Transcriptase dell' Invitrogen.

Sono stati aggiunti i seguenti componenti nelle eppendorf apposite nuclease-free:

| | |
|--------------------------|---------|
| Random primers | 1µl |
| 1ng to 5µg RNA totale | xµl |
| dNTP Mix (10µM ciascuno) | 1µl |
| Sterile,acqua distillata | to 12µl |

La soluzione è stata scaldata a 65°C per 5 minutes poi son stati aggiunti i seguenti reagenti:

| | |
|------------------------|-----|
| 5X First-Strand Buffer | 4µl |
| 0.1M DTT | 2µl |

La soluzione è stata quindi incubata per 2 minuti a 42°C e successivamente, è stato aggiunto 1µl (200 units) di SuperScript™ II RT e 1µl di acqua distillata per raggiungere il volume finale di 20µl. La soluzione è stata prima incubata a 25°C per 10 minuti e poi a 42°C per 50 minuti. Alla fine la reazione è stata inattivata scaldandosi a 70°C per 10 minuti.

3.2.11 qReal Time PCR

3.2.11.1 Procedura sperimentale

MATERIALI:

- Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, cat. n° 11733-038)
- ROX colore di riferimento
- Acqua sterile
- Primers 40 µM senso e non senso (Sigma)
- Piastre da 96 pozzetti ottici sterili con un codice a barre (codice 128) per RT-qPCR (Applied Biosystems, cat. n° 4306737)
- pipette con filtri sterili
- ABI PRISM 7000 REAL TIME PCR

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) è un sistema che permette di monitorare la progressione della PCR mentre si sta svolgendo (in real time).

Questo saggio quantitativo misura il valore dell'acido nucleico target durante ciascun ciclo d'amplificazione di PCR. Il target potrebbe essere DNA, cDNA o RNA. Per i nostri studi noi abbiamo utilizzato Syber Green I Dye chemistry. Il Syber Green I Dye rivela i prodotti della reazione di polimerizzazione a catena legando i doppi filamenti di DNA formati durante la PCR. Mentre la PCR procede vengono creati molti ampliconi. Fino a quando il Syber Green I Dye si è legato tutto al doppio filamento di DNA, il risultato è un incremento di fluorescenza proporzionale alla quantità dei prodotti di PCR prodotti. Più alto è il numero di copie di partenza dell'acido nucleico target, più velocemente si osserverà un significativo incremento in termini di fluorescenza. Real-time PCR segue la cinetica delle reazioni d'amplificazione durante la fase iniziale esponenziale. Il ciclo iniziale di PCR, nel quale si verifica un piccolo cambiamento del segnale di fluorescenza, definisce il valore basale per il tracciato d'amplificazione. Un incremento di fluorescenza oltre al valore basale indica la rilevazione del target accumulato. Un valore soglia di

fluorescenza già fissato può essere posto oltre la baseline. Il parametro C_T (threshold cycle) è definito come il numero di cicli minimo al quale la fluorescenza supera il valore soglia fissato.

Quando SYBR Green I Dye è in soluzione genera bassi livelli di fluorescenza, ma durante la fase di estensione aumenta il suo stesso segnale, dal momento che aumenta la quantità di colorante che lega il nuovo DNA sintetizzato. Durante la fase di denaturazione, il SYBER Green legando il DNA torna in soluzione e i suoi livelli d'emissione ritornano ai livelli del background. Di conseguenza, per monitorare l'incremento della quantità dei prodotti di reazione, la fluorescenza è misurata alla fine della fase d'estensione, quando la massima quantità di SYBER Green lega DNA.

Nel nostro lavoro RT-PCR è stato usato per quantificare i livelli d'espressione dei seguenti trascritti: BECLIN, BNIP3, LC3, P62, PINK1, PARKIN (geni relativi all'autofagia) e MFN1 (gene relativo alla dinamica mitocondriale) e come geni housekeeping sono stati utilizzati rispettivamente: RPLPO e BETA2GLOBULIN. Anche i livelli di mtDNA sono stati quantificati con la RT-PCR. Il gene mitocondriale analizzato è stato oil citocoromo b, mentre il gene housekeeping era un gene nucleare APP (Amyloid Precursor Protein). In questo caso la RT-PCR viene fatta nel DNA e non nel cDNA come accade per le altre analisi.

Per quantificare BNIP3, LC3, P62 le mix seguenti son preparate per un campione:

| REAL-TIME PCR | |
|------------------------|-------------|
| Supermix buffer | 6.25µl |
| Senso 10µM primers | 0.5µl |
| Non senso 10µM primers | 0.5µl |
| ROX | 0.25µl |
| Acqua sterile | 12.5µl |
| Campione DNA | 5µl |
| Final volume | 25µl |

I primers hanno le seguenti sequenze:

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| BNIP3 F | 5'- GCATGAGTCTGGACGGAGTA-3' |
| BNIP3 R | 5'- GTTTCAGAAGCCCTGTTGGT-3' |
| LC3 F | 5'- CATGAGCGAGTTGGTCAAGA-3' |
| LC3 R | 5'- CTCGTCTTTCTCCTGCTCGT-3' |
| P62 F | 5'- GTGGTAGGAACCCGCTACAA-3' |
| P62 R | 5'- GAGAAGCCCTCAGACAGGTG-3' |
| PARKIN F | 5'- AAAGGCCCTGTCAAAGAGT-3' |
| PARKIN R | 5'- ATCATCCCAGCAAGATGGAC-3' |
| PINK1 F | 5'- CCAAGTTTGTGTGACCGGC-3' |
| PINK1 R | 5'- CTTCATAACGAGGAACAGCGTCC-3' |
| RPLPO F | 5'- GAT GAC CAG CCC AAA GG-3' |
| RPLPO R | 5'- GTG ATG TGC AGC TGA TCA AGA CT-3' |
| MFN1 F | 5'- TGT TTT GGT CGC AAA CTC TG -3' |
| MFN1 R | 5'- CTG TCT GCG TAC GTC TTC CA -3' |
| BETA2GLOBULIN F | 5'-ATG AGT ATG CCT GCC GTG TGA-3' |
| BETA2GLOBULIN R | 5'-GGC ATC TTC AAA CCT CCA TG-3' |

Per valutare la quantità minima di cDNA necessaria per la quantificazione dell'espressione di ognuno dei seguenti geni: BNIP3, LC3, P62, è stata creata una curva standard utilizzando un mix di cDNA di tutti i campioni da analizzare. Sono state fatte

diluizioni seriali 1:2 partendo da 80ng/5µl a 0.625ng/5µl del mix di partenza. La RT-PCR ottenuta ci ha permesso di considerare ottimale la concentrazione di lavoro pari a 10ng/5µl per LC3, p62, e BNIP3. Per PINK1 e PARKIN, notoriamente poco espressi nelle cellule, è stata creata una retta con le seguenti concentrazioni: 20ng/5µl -50ng/5µl -75ng/5µl -100ng/5µl -1500ng/5µl, PINK1 è stato utilizzato ad una concentrazione di 75ng/5µl e PARKIN di 100ng/5µl.

3.2.11.2 Analisi dei dati

Sono possibili due tipi di quantificazione per i reagenti con Syber Green: quantificazione assoluta o relativa. La quantificazione relativa è stata utilizzata per le misurazioni d'espressione di BNIP3, LC3, P62, PINK1, PARKIN

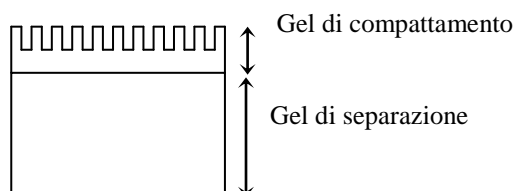
MFN1. L'espressione genica è stata misurata con la quantificazione del cDNA convertito dal RNA messaggero relativo al campione calibratore servendo come riferimento fisiologico. Noi abbiamo utilizzato le cellule wild-type come campione calibratore.

Tutte le quantificazioni sono anche state normalizzate per un controllo endogeno per poter spiegare la variabilità nella concentrazione iniziale e qualità dell'RNA totale e nell'efficienza di conversione della reazione di trascrizione inversa. Il nostro gene di controllo è stato per i geni dell'autofagia RPLPO mentre per MFN1 è stato B2GLOBULINA. Invece, l'mtDNA fu quantificato con una quantificazione assoluta. In questo caso il C_T di un campione ignoto è stato comparato ad una curva standard con un noto copy numbers. La curva standard è stata creata usando DNA di ibridi WT 0% MELAS. La diluizione partiva da una concentrazione di 50ng/5µl a 0.08ng/5µl utilizzando diluizione 1:5. La concentrazione di ciascun campione di DNA è stata quantificata prima dell'esperimento e poi diluita per poter ottenere soluzioni funzionali di 1ng/µl e 0.2ng/µl. Entrambe sono state utilizzate per preparare 2 campioni ciascuna.

3.2.12 Estrazione di proteine, SDS-Poliacrilamide gel elettroforesi (SDS-PAGE) e western blot

Estrazione proteica: sono state piastrate 750.000 cellule in dischi da 100mm, tripsinizzate dopo 24 ore e lavate con PBS. Il pellet ottenuto, dopo una centrifugata a 12000rcf per 5 min, è stato lisato rimanendo per 30 minuti in ghiaccio con 100µl of RIPA buffer (65mM Tris, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na-DOC, 1mM EDTA, pH 7.4) e 7µl di un cocktail di inibitori delle proteasi (PIC-Sigma P8340). Il lisato cellulare è stato quindi centrifugato a 13.000g per 15 minuti a 4°C e il surnatante stoccato -80°C fino al momento dell'uso.

SDS-Poliacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE): SDS-poliacrilamide gel electrophoresis è formato da gels verticali costituiti da due parti: una di accumulo l'altra di separazione.



Il sistema Laemmli [163] è un sistema discontinuo in sodiododecilsolfato SDS nel quale i peptidi sono impilati nel gel d'accumulo prima di entrare nel gel di separazione. La migrazione dei peptidi dipende esclusivamente dal loro peso molecolare perchè l'SDS, un detergente anionico, denatura le proteine e le avvolge completamente conferendole una carica negativa proporzionale alla loro lunghezza. In questo modo ciascuna proteina mostra una carica negativa per unità di lunghezza. Una quantità uguale di proteine per ciascun campione è stata caricata nel gel.

| Mix per un mini-gel dallo spessore di 1.5mm | | | |
|---|-------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Reagenti | Gel di corsa 12% | Gel di corsa 8% | Gel di compattamento |
| 30% Acrylamide- bisacrylamide (Sigma Cat. n. A3574) | 3ml | 2ml | 0.415ml |
| H ₂ O bd | 2.5ml | 3.5ml | 1.75ml |
| 1.5M Tris pH=8.8 | 1.875ml | 1.875ml | / |
| 0.5M Tris pH=6.8 | / | / | 0.34ml |
| 10% SDS | 75µl | 75µl | 25µl |
| TEMED | 7.5µl | 7.5µl | 2.5µl |
| 10% APS | 75µl | 75µl | 25µl |
| Volume finale | 7,5ml | 7,5ml | 2,5ml |

Le proteine estratte sono state preparate con un buffer di caricaento 5X e denaturate per 5 minuti a 99°C.

| BUFFER DI CARICAMENTO5X | | |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|
| reagenti | concentrazione finale | quantità |
| 0.5M Tris pH=6.8 | 125mM | 1ml |
| SDS | 10% | 0.4g |
| Glycerol | 50% | 2ml |
| Bromophenol blue | 0.2% | 8mg |
| β-mercaptoethanol | 25% | 1ml |

I campioni sono stati caricati nel gel con un indicatore molecolare di grandezza (BIORAD prestained SDS-PAGE standards), questo permette di controllare la separazione delle proteine di interesse. La corsa elettroforetica è svolta in un buffer SDS/Tris-Glycine (0.1% SDS, 25mM Tris-HCl, 250mM Glycina), a 120V costanti per 1 ora e 30 minuti. Western Blot: dopo la separazione dei campioni nel gel d'acrilammide, le proteine sono state trasferite in una membrana di nitrocellulosa (PROTRAN BA85

0.45µm, Schleicher&Schuell Bioscience) per 2 ore a 400 mA costanti nel buffer di trasferimento (3g Tris-HCl, 14.4g Glycine, pH=8.3 and 10% methanol). L'efficienza di trasferimento è stata controllata versando red ponceau [0.1% w/v Ponceau S solution (Sigma Cat.n. P7170), 5% v/v acetic acid (Carlo Erba Cat. n. 401391)] sulla membrana. Il gel è stato colorato STAINED con la soluzione di colorazione (0.125% comassie blue, 50% methanol, 10% acetic acid) e decolorato con la soluzione di decolorazione (50% methanol, 10% acetic acid) per poter osservare se alcune proteine fossero rimaste nel gel. La membrana è stata bloccata con latte in polvere al 5% in TTBS (0.02 M Tris-HCl pH 7.5, 0.137 M NaCl, and 0.1% Tween 20) per un'ora a temperatura ambiente e successivamente incubato a 4°C con l'anticorpo primario. Per controllare che in ciascuna linea fosse stata caricata la stessa quantità, il segnale delle proteine d'interesse sono state normalizzate per il valore dell'actina. Gli anticorpi primari utilizzati nel nostro studio sono stati diluiti nella soluzione di bloccaggio. Essi sono: anti-BNIP3 anticorpo monoclonale (Sigma Aldrich, Cat. N° L7931, 1:1000); anti-Actin anticorpo monoclonale (Millipore, Cat. N° MAB1501, 1:4000); anti-LC3B anticorpo monoclonale (Sigma Aldrich, Cat. N° L7534, 1:1000); anti-p62/SQSTM1 monoclonal antibody (Sigma Aldrich, Cat. N° P0067, 1:2000), anti-PARKIN anticorpo monoclonale (Santa cruz sc-32282, 1:500), anti-PINK1 anticorpo monoclonale (Novus Biologicals, 1:500), anti-MFN1 anticorpo monoclonale (Millipore ABC41, 1:1000). Poi, la membrana è stata rilevata con un anticorpo secondario coniugato ad una perossidasi (Amersham Biosciences) diluito in una soluzione di bloccaggio 1:2500: anti-mouse per BNIP3, Actin, PARKIN, MFN1; anti-rabbit for BECLIN, LC3B, p62/SQSTM1, PINK1. Gli anticorpi legati sono stati visualizzati utilizzando un reagente ECL (Amersham Biosciences). La reazione si basa nell'ossidazione del substrato luminolo grazie alla perossidasi coniugata all'anticorpo secondario. Il luminolo dallo stato d'eccitazione decade allo stato basale emettendo un segnale luminoso con un massimo dopo 5-20

minuti che possono essere rilevati dall'esposizione di una pellicola autoradiografica per il tempo necessario.

Il segnale è stato quantificato utilizzando il programma Gel-Pro Analyzer.

3.2.13 Estrazione di mitocondri da colture cellulari umane

Le cellule sono state piastrate ad una concentrazione di 1500000-1750000 cellule per disco da 150 mm (ne uso 6 o più) in modo tale che le cellule adese alla piastra risultino confluenti al 60-70%. Le cellule adese alla piastra vengono tripsinizzate e pellettate con una blanda centrifugazione a 600g per 5 minuti. Il pellet cellulare ottenuto viene lavato per due volte con PBS freddo e al termine della seconda centrifugazione posto in ghiaccio; quindi (A) aggiunta al pellet la soluzione di omogenizzazione ipo-tonica 0,1X (3.5mM Tris-HCl, pH 7.8, 2.5 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂) in grado di rompere le cellule. (B) La sospensione cellulare viene omogenata con 10 strokes (battute-immersioni) usando il potter con la punta in teflon. (C) Subito dopo viene aggiunto 1/10 della soluzione iper-tonica 10X (0,35mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.25 M NaCl, 50 mM MgCl₂) ottenendo così una soluzione isotonica. (D) Tale omogenato viene centrifugato a 1200g per 3 minuti a 4°C per pellettare le cellule non rotte. Dopo la centrifugazione il surnatante viene trasferito in una falcon mentre il pellet viene nuovamente omogenato ripetendo i punti A-B-C-D.

Il surnatante ottenuto in quest'ultima centrifugazione viene unito a quello precedente; risospesi in questa soluzione si trovano i mitocondri. I mitocondri contenuti nel surnatante vengono pellettati in eppendorfs (mettere approssimativamente 1ml di surnatante per eppendorf) attraverso una centrifugazione a 15000g per 2 min a 4°C. I pellet ottenuti vanno conservati a -80°C fino all'utilizzo.

3.3 Altre tecniche

3.3.1 Attività citrato sintasi

L'analisi avviene con un metodo spettrofotometrico basato sulla riduzione d'assorbanza del 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Infatti in presenza dell'acido ossaloacetico (OAA), DTNB e l' AcetylCoA sono trasformati in 5-thio-2-nitrobenzoato [161]. L'assorbanza è registrata a 412nm per 5 minuti at 30°C.

| Citrato sintasi (CS) | | |
|---|---------------|-----------------|
| | Bianco | Campione |
| 10mM AcetylCoA | 30µl | 30µl |
| 10mM Acido Ossaloacetico (OAA) (in 0.1M Tris-HCl pH=8.1) | 50µl | 50µl |
| 10mM DTNB (in 0.1M Tris-HCl pH=8.1) | 100µl | 100µl |
| Campioni (mitocondri) | / | 5µl |
| H ₂ O | 820µl | 815µl |
| Lettura a 30°C a λ=412nm per 5 minuti | | |

L'attività enzimatica è stata calcolata utilizzando il fattore d'estinzione del DTNB ($\epsilon_{412}=13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). L'attività è stata espressa come nmoles/min/mg di proteine.

$$\text{Attività} = \frac{\Delta OD}{\text{min}} \times \frac{1}{13.6} \times \frac{1}{\text{mg.proteina}}$$

3.3.2 Fissaggio delle cellule su vetrino con paraformaldeide

MATERIALS:

- 4% paraformaldeide (PFA)
- PBS
- PBS + 0.02% BSA + Na-azyde

Questo metodo spiega come fissar le cellule.

L'intera procedura è stata svolta a temperatura ambiente

Le cellule, coltivate in dischi o vetrini, vengono lavate per tre volte in PBS e successivamente fissate con PFA 4% per 20 minuti. Quindi vengono lavati in PBS-0.02% BSA per tre volte in modo da eliminare il fissativo. Le cellule vengono utilizzate immediatamente o conservate a -20°C in Etanolo al 70%. Importante è il sigillo delle piastre da 12 o 24 pozzetti per impedire l'evaporazione dell'etanolo. Le cellule conservate in questo modo possono essere utilizzate anche dopo 1 anno.

3.3.3 Colorazione con MitoTracker[®] Red

MATERIALS:

- 125nM DMSO MitoTracker[®] Red CMXRos diluito in DMSO (Molecular Probes, cat. n. M7512) solution (from 1mM stock solution stored at -20°C protected from light)
- PBS (Oxoid, cat. n. BR0014G)

MitoTracker Red CMXRos è un colorante lipofilico rosso-fluorescente che colora i mitocondri in cellule vitali e il suo accumulo dipende dal potenziale di membrana. Per marcare i mitocondri le cellule sono state incubate con la sonda 125nM MitoTracker Red per 30 minuti, la quale passivamente diffonde attraverso la membrana plasmatica e si accumula nei mitocondri attivi. Una volta marcati i mitocondri le cellule si fissano su vetrino come spiegato nel punto 3.4.1. I vetrini così ottenuti possono essere osservati al microscopio confocale (LEICA TCS SP5).

3.3.4 Doppia colorazione: MitoTracker[®] Red e LC3

Dopo aver colorato i mitocondri come spiegato nel paragrafo precedente sugli stessi vetrini è stata fatta una seconda colorazione marcandoli con l'Ab anti LC3 in grado di visualizzare gli autofagosomi. I vetrini vengono lavati per 3 volte con PBS, quindi permeabilizzati con 0.3 % TRITON (in PBS) per 2 min. Successivamente si bloccano aggiungendo 0,5% BSA, 10% HS in PBS per 20 min. I vetrini vengono nuovamente lavati per 3 volte con PBS e lasciati a contatto con Ab anti-LC3 1:200 in 0,5% BSA 2% HS in PBS nella cameretta buia over night a 4 °C. Il giorno seguente vengono lavati per 4 volte con PBS quindi incubati per 1h a temperatura ambiente con l'Ab II anti Rabbit alexa verde 1:200 in 0,5% BSA, 2% HS in PBS. In fine vengono lavati per 3 volte in PBS e fissati su vetrino con montante con DAPI. Grazie a questa doppia colorazione sarà possibile visualizzare di colore rosso i mitocondri, in verde gli autofagosomi e in blu i nuclei.

3.4 Analisi d'immagini

Le immagini acquisite con il microscopio confocale Leica SP5 mediante stack di 0.5µm e sono state analizzate con il programma imageJ (Fiji) capace di calcolare, valutando i pixel, sia la quantità di fluorescenza emessa singolarmente da un fluoroforo che la colocalizzazione di due segnali di fluorescenza. Nel nostro caso specifico è stato valutato sia singolarmente il segnale verde presente nelle cellule marcate per LC3 (autofagosomi), che il segnale giallo ottenuto dalla colocalizzazione degli autofagosomi e dei mitocondri ed espresso come autofagosomi/ cellula o mitofagia/cellula.

3.5 Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm SD. L'analisi statistica delle differenze del gruppo è stata calcolata utilizzando il Student test.. Le differenze sono state considerate significative al 95% di confidenza con $P < 0.05$.

4 RISULTATI

PRIMA PARTE

4.1 Creazione e caratterizzazione di ibridi RD 80% eteroplasmici MELAS A3243G Down regolati per Mfn1

La dinamica mitocondriale e gli eventi di fissione e fusione probabilmente interferiscono con la segregazione dell' mtDNA..

Per comprendere l'impatto che hanno le proteine coinvolte nella fissione e fusione mitocondriale nella segregazione del' mtDNA sono stati modificati i livelli di espressione di Mitofusina1 (MFN1) mediante RNA interference.

4.1.1 Ibridi RD MELAS 80% mutati

4.1.1.1. Raccolta cloni

I ibridi eteroplasmici RD MELAS A3243G con l'80% di mutazione sono stati trasfettati con un controllo negativo HuSH shRNA Plasmid pRS e a costrutti pRS Mfn1- RNAi, per ottenere rispettivamente dei cloni di controllo e dei cloni silenziati specificatamente per la proteina Mfn1.

Precedentemente era stato scelto il costrutto più idoneo al silenziamento sui 3 forniti dal kit di acquisto dalla ditta Origene Technologies.

Sono stati raccolti 21 cloni di controllo, 6 di questi sono stati scelti per condurre lo studio; sono stati chiamati con la seguente sigla: CTR1, CTR2, CTR3, CTR4, CTR5, CTR6 e CTR7.

Dopo la trasfezione con pRS MFN1- RNAi sono stati ottenuti 11 cloni. Tutti questi sono stati testati con western blotting per osservare la down regolazione di Mfn1. In 6 di questi

cloni l'espressione di Mfn1 era inferiore del 30%rispetto ai controlli, e sono stati scelti per lo studio. I cloni sono stati chiamati MFN1, MFN2, MFN3, MFN4, MFN5 e MFN6. La quantità di MFN1 presente nei lisati totali dei cloni scelti è mostrata nella Figura 4.1.1.

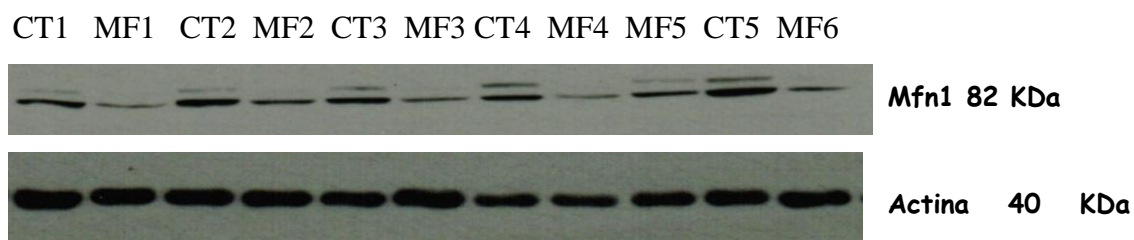


Figura 19: Analisi con western blot di MFN1 nei cloni di controllo (CTR) e nei cloni down regolati per MFN1 (MF)

L'intensità delle bande è stata quantificata con il software Gel-Pro Analyser3, Mfn1 è stata normalizzata con l'actina..La quantità di proteina è stata espressa come percentuale della media dei valori ottenuti dai 6 controlli, considerata come il 100%, (vedi la tabella 4.4.1 e la figura 4.4.1).In tutti i 6 cloni down regolati, Mfn1 è risultata significativamente ridotta, con un massimo di riduzione nel clone MFN2, dove la presenza era diminuita al 10%, e un minimo di riduzione nel clone MFN3 al 52% rispetto ai controlli (vedi la tabella 4.4.1 e la figura 4.4.1).

| CLONI | Quantità di Mfn1/ actina | | | |
|-------|--------------------------|-----------|------------|-----------|
| | Valore I | Valore II | Valore III | media±ds. |
| CTR1 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| CTR2 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| CTR3 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| CTR4 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| CTR5 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| CTR6 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| MFN1 | 52% | 38% | 47% | 46%±0,07 |
| MFN2 | 6% | 7% | 17% | 10%±0,06 |
| MFN3 | 66% | 24% | 65% | 52%±0,23 |
| MFN4 | 13% | 56% | 10% | 26%±0,25 |
| MFN5 | 37% | 23% | 43% | 34%±0,01 |
| MFN6 | 50% | 39% | 36% | 36%±0,07 |

Tabella 4.1.1: quantità della Mfn1 nei cibridi downregolati per MFN, rispetto ai cloni di controllo (CTR). La proteina è stata quantizzata con western blot, come percentuale rispetto ai cibridi di controllo. Il segnale è stato normalizzato con l'actina

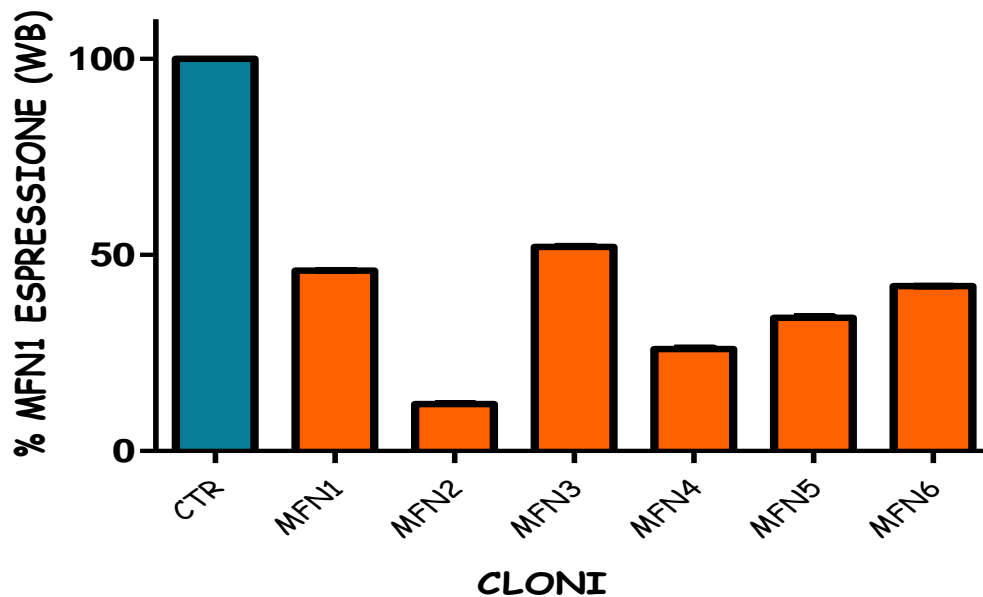


Figura 20: quantità della Mfn1 nei ibridi downregolati per MFN, rispetto ai cloni di controllo (CTR). La proteina è stata quantificata con western blot, come percentuale rispetto ai ibridi di controllo. Il segnale è stato normalizzato con l'actina

4.1.1.2 Real-Time PCR

La down-regolazione di Mfn1 è stata inoltre valutata con Real-Time PCR. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto al gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina ribosomiale acida). La media dei valori ottenuti per i 6 controlli è stata considerata come il 100% d'espressione ed i valori ottenuti per gli altri cloni sono stati confrontati con il valore medio dei controlli. I risultati sono riassunti nella seguente tabella.

| CLONI | Mfn1 espressione |
|-------|------------------|
| CTR1 | 100% |
| CTR2 | 100% |
| CTR3 | 100% |
| CTR4 | 100% |
| CTR5 | 100% |
| CTR6 | 100% |
| MFN1 | 80% |
| MFN2 | 52% |
| MFN3 | 56% |
| MFN4 | 54% |
| MFN5 | 59% |
| MFN6 | 90% |

Tabella 4.1.2: Quantificazione dell'espressione di Mfn1 nei cibridi downregolati per MFN1, rispetto ai cloni di controllo (CTR), ed espressa come percentuale rispetto ai cloni di controllo CTR. I campioni sono stati analizzati in triplicato con Real-Time PCR.

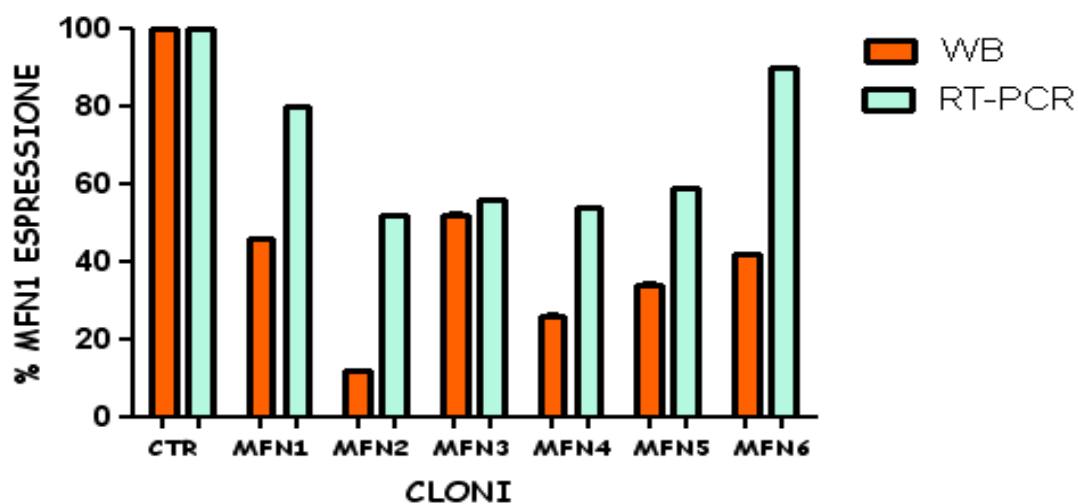


Figura 21: Quantificazione di Mfn1 con western blot e Real-Time PCR, Come percentuale d'espressione nei cloni MFN rispetto ai cloni di controllo CTR.

4.1.1.3 Quantificazione dell' mtDNA mutato

Perevidenziare se la down-regolazione di Mfn1 influenza la segregazione dell' mtDNA mutato e wild-type, la percentuale di mutazione è stata quantificata con la Hot-PCR (guarda paragrafo 3.2.6). La figura 22 mostra i risultati della LC Hot PCR dopo la digestione over night con l'enzima di restrizione Apa1.

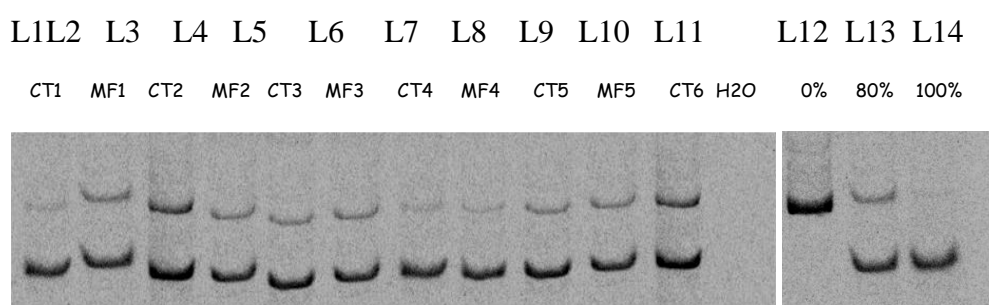


Figura 22: analisi phosphor-image dei campioni dopo la digestione con Apa1. Le linee L1-3-5-7-9-11 sono i cloni di controllo (CTR); le linee L2-4-6-8-10 sono i cloni MFN; linee L12-13-14 sono gli standard interni.

| Cloni | %mtDNA mutato |
|-------|---------------|
| CTR1 | 87,9%±5,22 |
| CTR2 | 87,2%±5,23 |
| CTR3 | 93,7%±2,95 |
| CTR4 | 92,6%±2,97 |
| CTR5 | 95,7%±2,23 |
| CTR6 | 90,5%±2,61 |
| CTR7 | 89,2%±2,13 |
| MFN1 | 89,2%±2,10 |
| MFN2 | 90,9%±2,05 |
| MFN3 | 74,8%±2,49 |
| MFN4 | 92,3%±1,61 |
| MFN5 | 91,0%±2,12 |

Nei controlli il valore medio della percentuale di DNA mitocondriale mutato è $90,97 \pm 3,13$ mentre nei cloni con Mfn1 down-regolata la percentuale di mtDNA mutato è $87,63 \pm 7,27$. Questi risultati mostrano una riduzione del DNA mitocondriale nei cloni con Mfn1 down-regolata. Questa riduzione è stata analizzata dal test t-Student e non è risultata statisticamente significativa: $p=0.298$.

4.1.1.4 Morfologia mitocondriale

La Mitofusina1 è coinvolta nella fusione mitocondriale, le cellule down regolate per tale proteina dovrebbero mostrare un incremento della frammentazione mitocondriale, quindi avere un numero maggiore di mitocondri dalla forma corpuscolare. Ho osservato la morfologia dei mitocondri delle cellule down-regolate per Mfn1, cresciute in un vetrino. Per fare ciò i mitocondri sono stati colorati con Mito Tracker Red, una sonda fluorescente target mitocondriale: Successivamente sono state prese delle immagini al microscopio confocale. (guarda paragrafo 3.3.3)

Le figure 4.1.5 mostrano, come ci si aspettava, che i cibridi MELAS A3243G trasfettati con il vettore vuoto hanno una forma simile alle cellule non trasfettate mentre le cellule down-regolate per Mfn1 hanno un incremento significativo della frammentazione mitocondriale ($P < 0,000$).

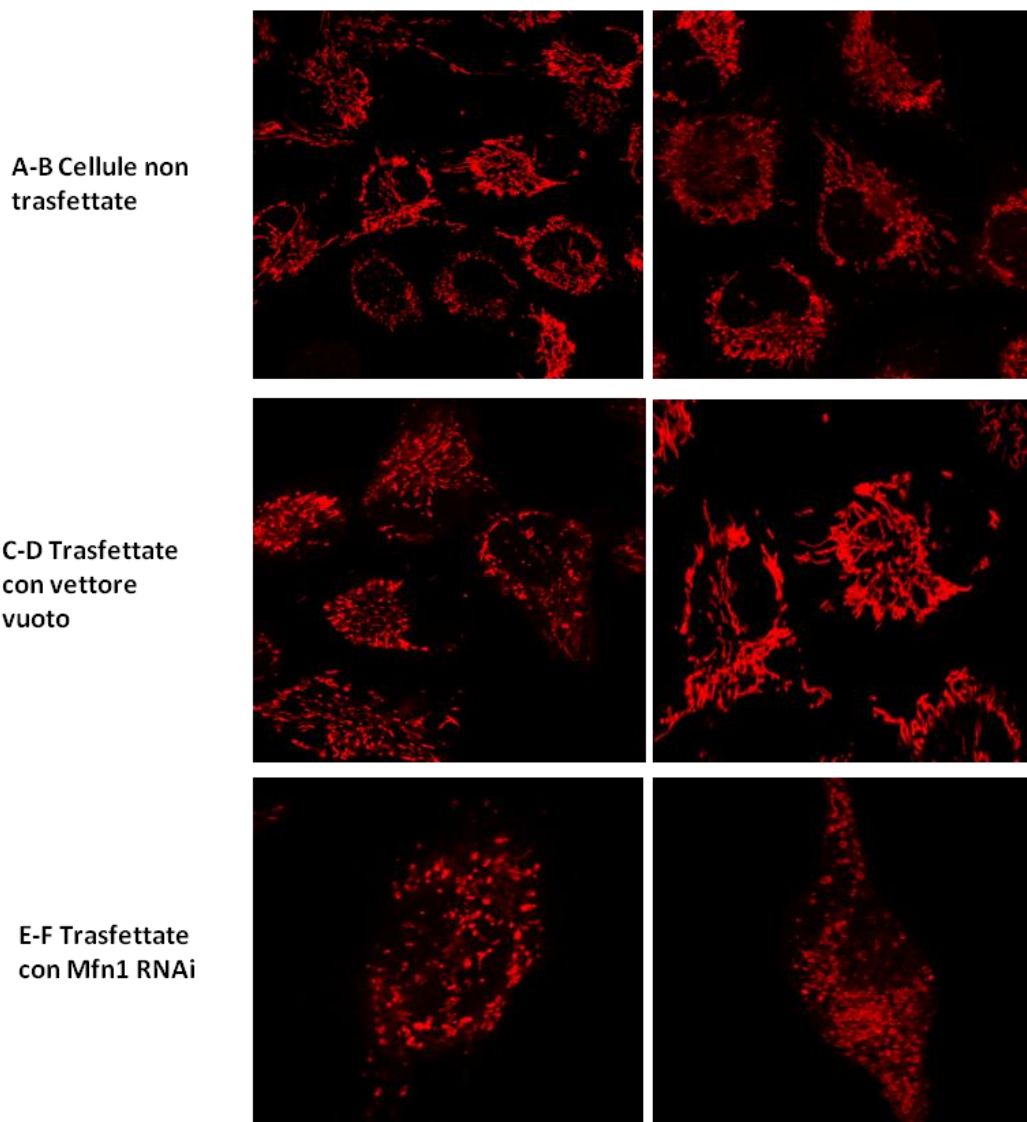


Figura 23: Forma mitocondriale e distribuzione: A-B) ibridi RD MELAS 80% non trasfettati; C-D) ibridi RD MELAS 80% trasfettati con vettore vuoto E-F) ibridi RD MELAS 80% trasfettati con Mfn1 RNAi. Per colorare i mitocondri è stato utilizzato MitoTracker Red e le immagini sono state prese utilizzando il microscopio confocale.

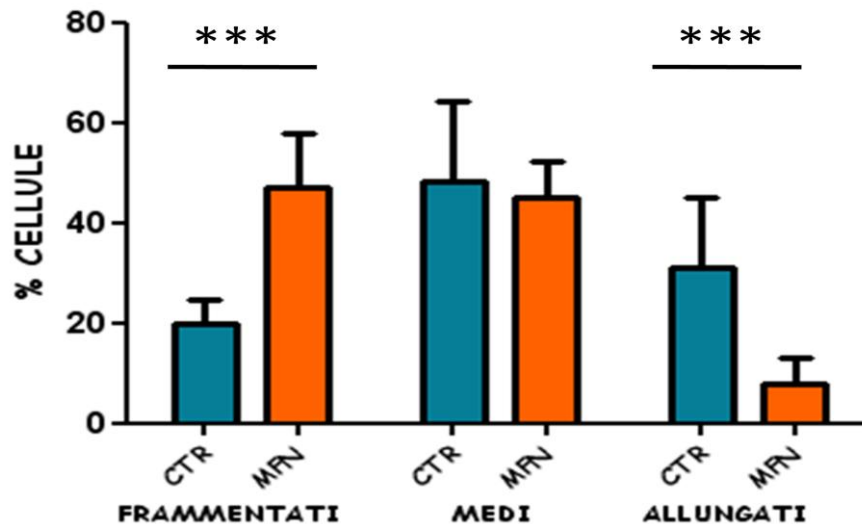


Figura 24:Numero percentuale di cellule con all'interno mitocondri frammentati, medi o allungati. Di colore blu i controlli: cibridi trasfettati con vettore vuoto, di colore arancione: cibridi trasfettati con RNAi per MFN1.

In totale analizzate 541 cellule dicibridi 80% MELAS A3243G trasfettati con vettore vuoto (CTR), e 606 cellule di cibridi 80% MELAS A3243G down-regolati per Mfn1. La media della percentuale di cellule con mitocondri frammentati nei cibridi di controllo è di $19,83 \pm 4,67\%$ mentre nei cloni con Mfn1 down-regolata è di $47,00 \pm 10,90\%$. Questi risultati mostrano un aumento delle cellule con mitocondri dalla forma corpuscolare nei cibridi Mfn1 RNAi. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo: $P < 0.00$. La media della percentuale di cellule con mitocondri allungati nei cibridi di controllo è di $31,00 \pm 14,02\%$ mentre nei cloni con Mfn1 down-regolata è di $8 \pm 4.96\%$. Questi risultati mostrano una diminuzione delle cellule con mitocondri dalla forma allungata nei cibridi Mfn1 RNAi. Questa diminuzione è stata analizzata dal test t-Student ed è risultata statisticamente significativa: $P < 0.00$.

PARTE SECONDA

4.2 Autofagia e mitofagia

Il DNA mitocondriale mutato è favorito nei cibridi di muscolo (A.Malena et al. 2010) mentre è sfavorito nei cibridi di polmone (Dumbar et al. 1996). Ipotizzando che la mitofagia selettiva dei mitocondri alterati possa essere uno dei motivi in grado di spiegare la diversa segregazione del DNA mitocondriale mutato in queste due gruppi di cellule, si è voluto studiare il macchinario autofagico e la mitofagia in linee di cibridi con background di polmone e muscolo con una diversa percentuale di mutazione. In questo studio sono stati utilizzati: (i) cibridi muscolari RD MELAS A3243G con la seguente percentuale di mutazione: RD 0%, 70%, 80%, 99% e (ii) cibridi polmonari A549 MELAS A3243G con la seguente percentuale di mutazione: B₂0%, 35%, 70%, 99%. Abbiamo quindi analizzato l'espressione genica, mediante RT-PCR, e la presenza proteica, mediante Western Blot, delle più importanti proteine coinvolte in questi processi. Per l'autofagia sono state analizzate: LC3, p62 mentre per la mitofagia sono state analizzate PINK1, Parkin e BNIP3. I dati così ottenuti sono stati ulteriormente avvalorati dai risultati ottenuti con l'imaging dove sono stati valutati i fagosomi (autofagia) e i punti di colocalizzazione tra gli autofagosomi e i mitocondri (mitofagia). Per valutare il flusso autofagico, tutte le cellule sono state tenute per sei ore in presenza o assenza di Cloroquina (50µM) che blocca la degradazione autofagica da parte dei lisosomi dopo la formazione degli autofagosomi.

4.2.1 LC3

LC3 (protein light chain 3) generalmente si trova nel citoplasma ma, dopo l'induzione dell'autofagia viene proteolicamente clivata da una proteasi cisteinica generando LC3-B. Quest'ultima viene reclutata per la formazione dell'autofagosoma, localizzandosi sulla

superficie di esso, dove gioca un ruolo sia nella emifusione delle membrane che nel riconoscimento selettivo del cargo e conseguente degradazione. Quindi la sintesi e la processazione di LC3 è aumentata durante l'autofagia, risultando così essere una proteina di riferimento dei livelli di autofagia nella cellula.

4.2.1.1 LC3 nel polmone

Espressione genica: i livelli di mRNA di LC3 sono stati quantificati con Real-time PCR (vedi paragrafo 3.2.11) e normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale). La media dei valori ottenuti nei tre controlli B₂0% A-B-C è stata considerata come il 100% d'espressione. I valori trovati nei ibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli. I risultati mostrano un aumento d'espressione nei ibridi 35% e 99% mutati del 114% e 110% rispetto ai controlli. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con p=0.000.

Quantità di proteina: la quantità proteica di LC3 è stata analizzata con Western Blot e normalizzata con l'Actina. L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3. Il valore medio ottenuto nei tre controlli B₂0% A-B-C è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei ibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli. I risultati mostrano un aumento della quantità di LC3 nei ibridi 70% e 99% mutati del 195% e 160% rispetto ai controlli. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con p=0.000.

Tutti i ibridi B₂ sono stati trattati in parallelo con Cloroquina 50µM per 6 ore. È stato quindi valutato per ogni linea cellulare il rapporto tra il valore trovato nelle cellule trattate (+CLQ) rispetto a quello trovato nelle cellule non trattate (-CLQ). I risultati mostrano un aumento di LC3 in tutte le cellule trattate con Cloroquina, nei ibridi B₂ 0%

e 35% quest' aumento del 227%, 213% è risultato statisticamente significativo con $p=0.000$, analizzato mediante test t-Student,.

L'incremento, ottenuto dal rapporto tra cellule trattate e non trattate con CLQ indica il flusso autofagico. Questo è notevolmente ridotto nei ibridi eteroplasmici B₂70% e 99% rispetto a quello dei, sono diminuiti rispettivamente del 60% e 55%. Tali risultati sono stati analizzati con il test t-Student ed il decremento considerato è risultato statisticamente significativo con un $p = 0,000$.

Considerazioni LC3 polmone: l'espressione genica di LC3 mostra un aumento nei ibridi eteroplasmici rispetto ai wild type e tale aumento viene confermato anche dalla quantizzazione proteica di LC3 con western blot. Si può quindi dire che nei ibridi polmonari vi è un aumento di autofagosmi nella cellula all'aumentare della percentuale di mutazione. Inoltre l'incremento della proteina, ottenuto con l'aggiunta di cloro china, indica un forte turnover degli autofagosomi rappresentando così un'autofagia non solo abbondante ma anche ben funzionante.

4.2.1.2 LC3 nel muscolo

Espressione genica: nei ibridi di muscolo si sono quantizzati i livelli di espressione di LC3 come specificato precedentemente per il polmone . La media dei valori ottenuti nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stata considerata come il 100% d'espressione mentre i valori trovati nei ibridi: 70%-80%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli. I risultati evidenziano una notevole riduzione dell'espressione di LC3 del 90% rispetto ai controlli nei ibridi al 70% e 80%, ($p<0.000$) Mentre i ibridi al 99% mostrano un aumento del 37% che è risultato statisticamente significativo con $p = 0,001$.

Quantità di proteina: la quantità proteica di LC3 è stata analizzata con Western Blot ed i valori ottenuti sono stati normalizzati con l'Actina. L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3. Il valore medio ottenuto nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei ibridi: RD70%-80%-99%mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli. In linea con i dati di espressione, anche la presenza proteica è diminuita nei ibridi al 70%, 80% e 99% mutati del 80%, 66% e 67% rispetto ai controlli. Questa diminuzione è stata analizzata dal test t-Student ed è risultata statisticamente significativa con $p=0.000$ per tutti e tre i ibridi eteroplasmici.

Il trattamento con Cloroquina non evidenzia alcuna variazione di LC3 nei ibridi omoplasmici WT 0% rispetto ai non trattati. Al contrario la Cloroquina determina un forte aumento di LC3 nei ibridi RD 70%-80%-99% mutati del 486%, 184% e 190%, rispetto ai non trattati. Statisticamente significativo per i ibridi RD70% con $p=0.006$ e RD 80%-99% $p=0.002$. L'incremento ottenuto dal rapporto tra cellule trattate e non trattate è indice del flusso autofagico, che è aumentato nei ibridi eteroplasmici RD 70%-80%-99% mutati rispetto a quello dei controlli. Tali risultati sono stati analizzati con il test t-Student e l'incremento è risultato statisticamente significativo con un $p = 0,000$.

Considerazioni LC3 muscolo: l'espressione genica di LC3 mostra una diminuzione nei ibridi eteroplasmici RD 70%-80% mutati rispetto ai wild type. Nonostante tale diminuzione si nota un forte incremento della proteina nei ibridi eteroplasmici RD 70%-80%-99% mutati, ottenuto con l'aggiunta di cloroquina, indica un forte turnover degli autofagosomi rappresentando così un'autofagia ben funzionante. Mentre il mancato incremento di LC3 dopo l'aggiunta di Cloroquina nei ibridi WT0% indica però che vi è un blocco dell'autofagia in questi ibridi malgrado vi siano tanti autofagosomi.

Confronto LC3 polmone/LC3 muscolo: I ibridi polmonari hanno un sistema di pulizia sempre più efficiente all'aumentare della percentuale di mutazione dell'mtDNA e già fortemente attivato nei ibridi omoplasmici B₂0%. Nei ibridi muscolari con mutazione un'espressione genica di LC3 è fortemente inferiore rispetto al controllo (RD 0%,) a differenza di quanto avviene nei ibridi polmonari mutati . Inoltre c'è un blocco dell'autofagia nei ibridi omoplasmici RD 0% mutati. Anche se la proteina a livelli basali non è molto alta sia nei ibridi eteroplasmici polmonari che muscolari il forte incremento che si verifica con l'aggiunta della Cloroquina indica un'autofagia funzionante in entrambi i tipi di cellule.

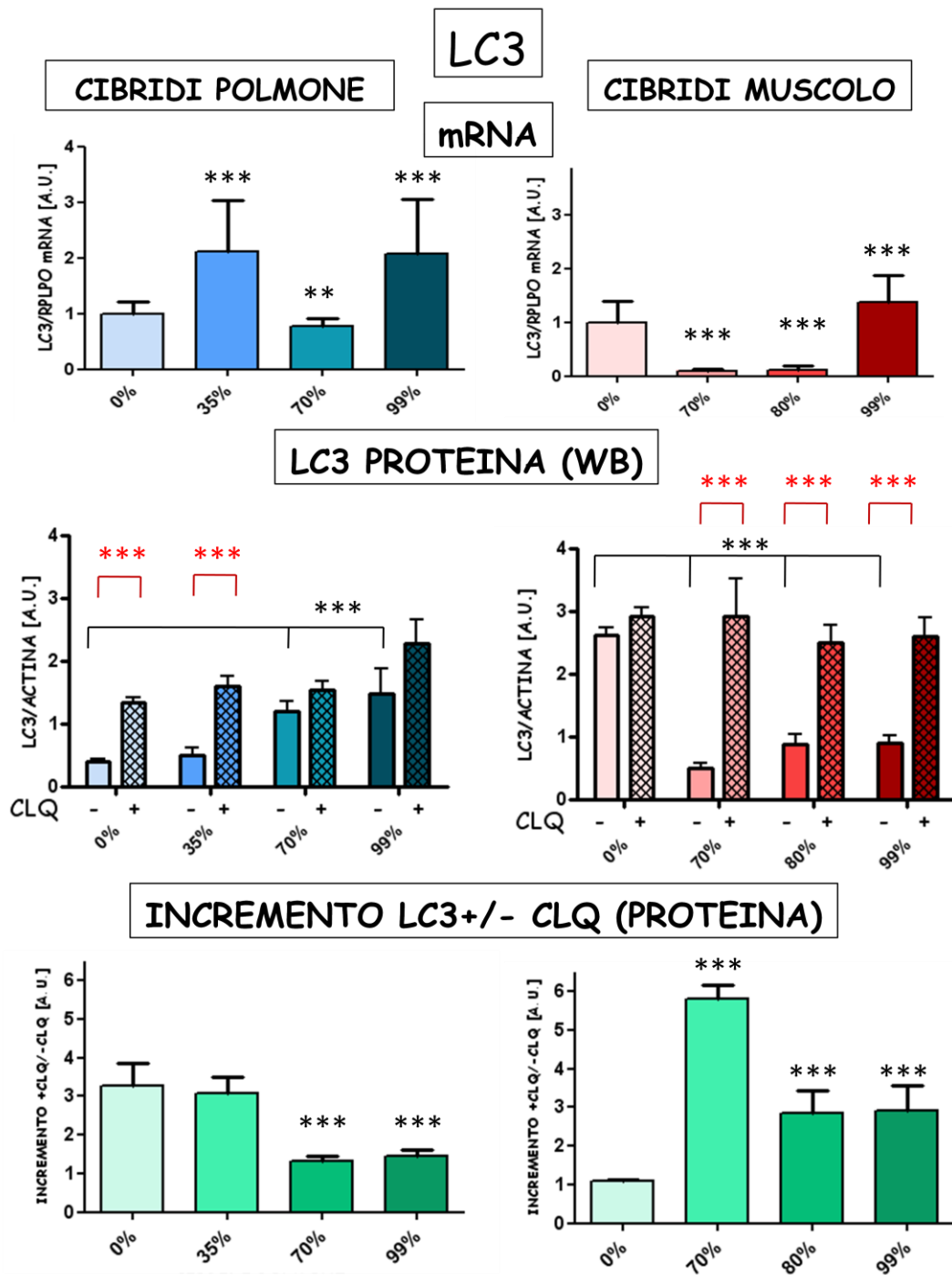


Figura 25: LC3 è stata valutata come mRNA (espressione RT-PCR), che come quantità di proteina (Western Blot) sia in cibridi trattati con Clorochina 50µM per 6 ore (+) che non trattati (-) ed è stato valutato l'incremento inteso come rapporto tra cellule trattate e non tarattate (+/-). I cibridi di controllo sono 0% mentre per il polmone i cibridi eteroplasmici hanno una percentuale di mutazione del 35% -70% e 99% mentre nel muscolo del 70%-80 e 99%.

4.2.2 p62

Sequestrosome 1/p62 (SQSTM1) è una proteina che interagisce con le proteine poliubiquitinate e può condurle direttamente al proteasoma o all'autofagosoma, è quindi una proteina chiave per un meccanismo di pulizia selettivo. Studi recenti mostrano un'interazione diretta tra p62 e LC3 che risulta indispensabile per la degradazione specifica del cargo. Precisamente p62 riconosce e si attacca alle proteine marcate con una catena poliubiquitinica e successivamente le conduce all'autofagosoma utilizzando LC3 come suo recettore. Per questa ragione anche p62 è una delle proteine chiave per lo studio dell'autofagia.

4.2.2.1 p62 nel polmone

Espressione genica: i livelli di mRNA di p62 sono stati quantificati con Real-time PCR (guarda paragrafo XX). I valori di mRNA di p62 sono stati normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale). La media dei valori ottenuti nei tre controlli B₂0% A-B-C è stata considerata come il 100% d'espressione. I valori trovati nei ibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli. I risultati mostrano una diminuzione significativa ($p < 0.000$) d'espressione del 63% solo nei ibridi con 70% di mutazione (con $p = 0.000$) rispetto ai controlli.

Quantità proteica: la quantità proteica di p62 è stata analizzata con Western Blot ed i valori ottenuti sono stati normalizzati con l'Actina. L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3. Il valore medio ottenuto nei tre controlli B₂0% A-B-C è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei ibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli. I risultati mostrano che non ci sono variazioni rilevabili tra il valore proteico dei ibridi B₂0% e i ibridi B₂35%-70%-99% mutati. Tutti i ibridi B₂

sono stati anche trattati con Cloroquina 50 μ M per 6 ore. E' stato quindi valutato per ogni linea cellulare il rapporto (incremento) tra il valore trovato nelle cellule trattate (+CLQ) rispetto a quello trovato nelle cellule non trattate (-CLQ). I risultati mostrano un debole incremento di p62 analogo tra i cibridi di controllo 0% e gli eteroplasmici B₂35%-70%-99% mutati.

Considerazioni p62 polmone: l'espressione genica di p62 mostra un decremento nei cibridi B₂70% mutati non in linea con gli altri cibridi polmonari che di poco si discostano dal valore medio dei cibridi di controllo; è difficile spiegare questo comportamento atipico. Mentre la quantizzazione proteica di p62 con western blot non mostra variazioni sia tra i valori di base che in seguito all'aggiunta di Cloroquina.

4.2.2.2 p62 nel muscolo

Espressione genica: i livelli di mRNA di LC3 sono stati quantificati con Real-time PCR (guarda paragrafo XX). I valori di mRNA di LC3 sono stati normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale). La media dei valori ottenuti nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stata considerata come il 100% d'espressione e gli altri cibridi: 70%-80%-99% mutati sono stati comparati al valore medio dei controlli. I risultati evidenziano un aumento dell'espressione nei cibridi al 70%-80% e 99% mutati del 85%, 51% e 44% rispetto ai controlli. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con p=0,000 nei cibridi al 70% e p=0,05 nei cibridi all'80%-99% di mutazione.

Quantità proteica: la quantità proteica di p62 è stata analizzata con Western Blot ed i valori ottenuti sono stati normalizzati con l'Actina. L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3. Il valore medio ottenuto nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei cibridi: RD70%-80%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli. I risultati mostrano una riduzione di p62 nei cibridi al 70%,

80% e 99% del 40%, 42%, e 65% ai controlli. Questa diminuzione è stata analizzata dal test t-Student ed è risultata statisticamente significativa con $p=0.000$ per tutti e tre i ibridi eteroplasmici. I ibridi RD 70%-80%-99% mutati ed i tre controlli wild type WT0% 1-2-3 sono stati trattati con Cloroquina $50\mu\text{M}$ per 6 ore. È stato quindi valutato per ogni linea cellulare il rapporto tra trattato (+CLQ) e non trattato (-CLQ) (o incremento). I risultati evidenziano un significativo aumento della proteina in seguito all'aggiunta di Cloroquina nei ibridi eteroplasmici RD 80%-99% mutati del 58% e del 100%. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con $p=0.03$ per i ibridi 80% mutati e $p=0,007$ per i ibridi 99% mutati. L'incremento, ottenuto dal rapporto tra cellule trattate e non trattate, indice del flusso autofagico, nei ibridi eteroplasmici RD 80%-99% mutati risulta significativamente aumentato del 48% e 100% ($p < 0.000$) rispetto a quello dei controlli.

Considerazioni p62 muscolo: l'espressione genica di p62 è aumentata nei ibridi eteroplasmici RD 70%-80%-99% mutati rispetto ai wild type, mentre negli stessi è ridotta la quantità di proteina basale. In parallelo si osserva che con l'aumentare della percentuale di mutazione dell'mtDNA l'aggiunta di Cloroquina determina un incremento significativo di p62 rispetto ai controlli. Nel complesso questi dati indicano un incremento dell'attività autofagica con l'aumentare della percentuale di mutazione dell'mtDNA.

Confronto p62 polmone/p62 muscolo: complessivamente nel polmone sia il livello di espressione genica di p62 che la quantità di proteina è indistinguibile nei ibridi di controllo e mutati. Nel muscolo invece osserviamo che nei ibridi eteroplasmici p62 è più espressa a livello di mRNA rispetto ai controlli e ha un maggiore turnover proteico, indice di un aumentato flusso autofagico.

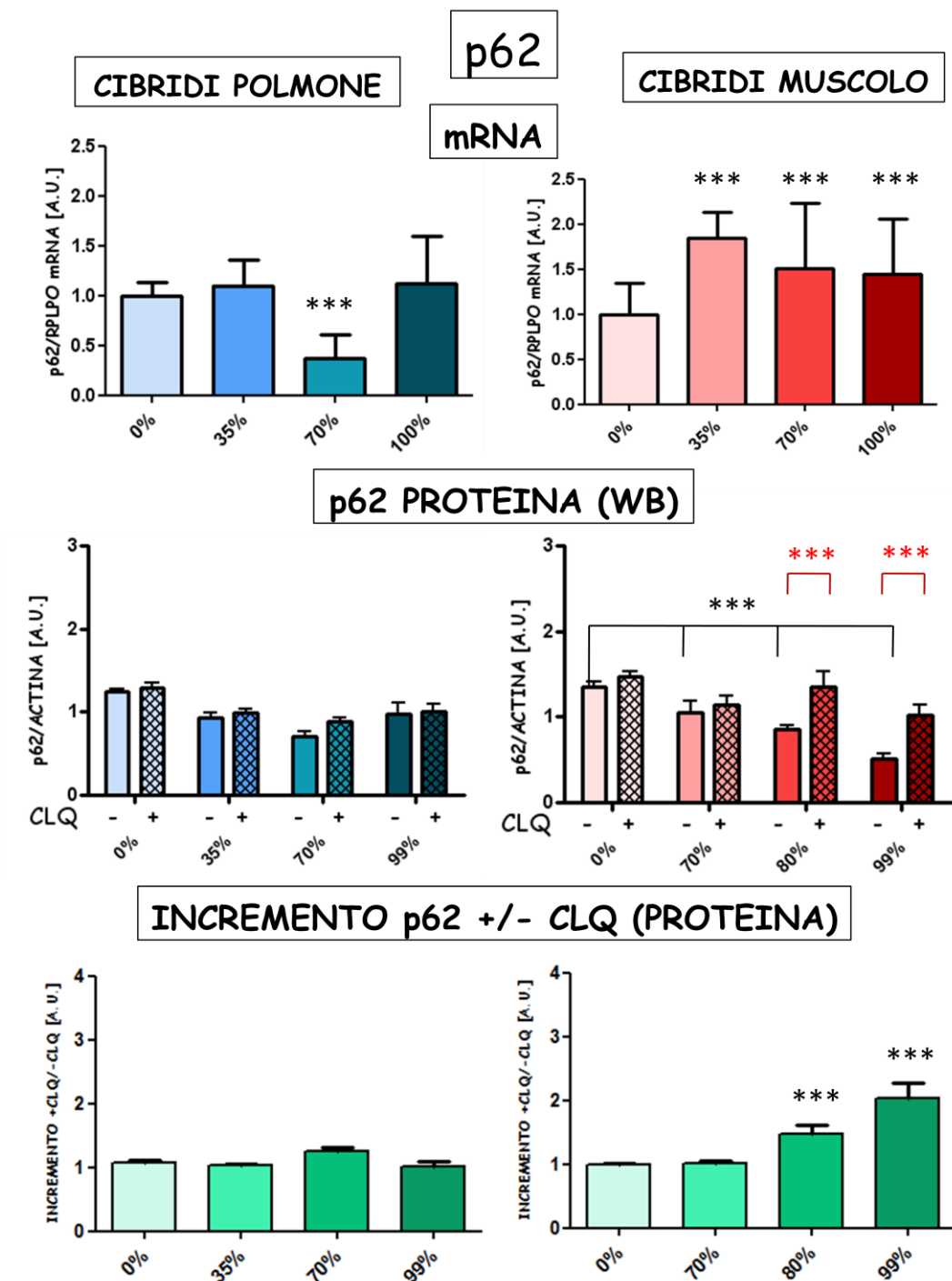


Figura 26: p62 è stata valutata come mRNA (espressione RT-PCR), che come quantità di proteina (Western Blot) sia in cibridi trattati con Clorochina 50µM per 6 ore (+) che non trattati (-) ed è stato valutato l'incremento inteso come rapporto tra cellule trattate e non tarattate (+/-). I cibridi di controllo sono 0% mentre per il polmone i cibridi eteroplasmici hanno una percentuale di mutazione del 35% -70% e 99% mentre nel muscolo del 70%-80 e 99%.

4.2.3 PINK1 e PARKIN

La chinasi 1 PTEN-indotta (PINK1) è una chinasi serina/treonina che contiene una sequenza di targeting mitocondriale che le permette così di localizzarsi sui mitocondri; tale proteina è associata alla malattia famigliare recessiva di Parkinson. Ha un ruolo protettivo contro la disfunzione mitocondriale e l'apoptosi, inoltre è conosciuta per essere regolatore di Parkin. PINK1 recluta l'E3 ubiquitina ligasi Parkin nei mitocondri in modo da poter iniziare la mitofagia. Nei mitocondri sani PINK1 è costitutivamente importata all'interno della membrana mitocondriale interna dove viene degradata dalle proteasi mitocondriali. La perdita del potenziale di membrana preclude a PINK1 la possibilità di essere trasportata all'interno della membrana interna accumulandosi così nella membrana mitocondriale esterna. In questo modo PINK1 serve come sensore del danno mitocondriale. L'accumularsi di PINK1 nella superficie esterna mitocondriale induce la traslocazione di Parkin dal citosol verso i mitocondri danneggiati. Una volta reclutata Parkin promuove la degradazione dei mitocondri alterati attraverso la mitofagia.

4.2.3.1 PINK1 nel polmone

Espressione genica: i livelli di mRNA di PINK1 sono stati quantificati con Real-time PCR (guarda paragrafo XX). I valori di mRNA di PINK1 sono stati normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale). La media dei valori ottenuti nei tre controlli B20% A-B-C è stata considerata come il 100% d'espressione. I valori trovati nei ibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli. I risultati mostrano (i) un aumento significativo d'espressione nei ibridi B2 35% e 99% mutati, del 46% e 90% rispetto ai controlli. ($p=0.000$); e (ii) una significativa riduzione ($p= 0,000$) del 62% nei cloni B2 70% mutati.

Quantità proteica: la quantità proteica di PINK1 è stata analizzata con Western Blot sui mitocondri isolati delle cellule, i valori ottenuti sono stati normalizzati con TOM, dato che questa proteina è poco presente e risulta difficilmente rilevabile sul lisato cellulare totale. L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3. Come detto precedentemente, il valore medio ottenuto nei tre controlli B20% A-B-C è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei ibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.. I risultati mostrano un aumento della quantità di proteina nei ibridi B2 70% e 99% mutati rispetto ai controlli del 2180% e 540% rispettivamente. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con $p=0.001$ per i ibridi al 70% di mtDNA mutato.

Tutti i ibridi B2 sono stati trattati in parallelo con Cloroquina $50\mu\text{M}$ per 6 ore. È stato quindi valutato per ogni linea cellulare il rapporto tra il valore trovato nelle cellule trattate (+CLQ) rispetto a quello trovato nelle cellule non trattate (-CLQ).

I risultati mostrano un enorme e significativo aumento di PINK1 dopo trattamento con CLQ nei ibridi B20% con $p=0.000$, ma non nei ibridi eteroplasmici B235%-70% e 99% mutati. Dato che l'incremento è considerato un indice del flusso autofagico, possiamo dire che nei ibridi eteroplasmici B235%-70% e 99% è presente un flusso autofagico significativamente ridotto rispetto alle cellule 0% per $p = 0,000$.

Considerazioni PINK1 polmone: complessivamente l'espressione genica di PINK1 mostra un aumento nei ibridi eteroplasmici rispetto ai wild type, che compensa il flusso autofagico e si ripercuote nell'aumento della presenza proteica di PINK1 con western blot. Infatti è un aumento di PINK1 nella membrana cellulare esterna dei ibridi eteroplasmici con l'aumentare della percentuale di mutazione. Il notevole incremento che si osserva nei ibridi di controllo B20% in seguito al trattamento con cloroquina indica

che le cellule hanno un forte flusso autofagico malgrado una sintesi proteica inferiore a quella presente nei ibridi eteroplasmici .

4.2.3.2 PINK1 nel muscolo

Espressione genica: i livelli di mRNA di PINK1 sono stati quantificati con Real-time PCR (guarda paragrafo XX). I valori di mRNA di PINK1 sono stati normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale). Il valore medio ottenuto nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei ibridi: RD70%-80%-99%mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

I risultati evidenziano un aumento dell'espressione nei ibridi70%-80% e 99% mutati del 62%, 37% e 169% rispetto ai controlli 0%. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con $p=0,0168$ nei ibridi 70% , $p=0,0137$ nei ibridi all'80% e $p=0,000$ nei ibridi al 99% di mutazione.

Quantità proteica: la quantità proteica di PINK1 è stata analizzata con Western Blot sui mitocondri isolati delle cellule ed i valori ottenuti sono stati normalizzati con TOM, dato che PINK1 è poco presente e risulta difficilmente rilevabile sul lisato cellulare totale.L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3. Come detto precedentemente,il valore medio ottenuto nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei ibridi: RD70%-80%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

I risultati mostrano una notevole diminuzione al 10% di quantità di proteina PINK1 nei ibridi RD 70%-80%-99%rispetto ai controlli 0%,($p=0.000$).

Tutti i ibridi RD sono stati trattati in parallelo con Cloroquina 50 μ M per 6 ore. È stato quindi valutato per ogni linea cellulare il rapporto tra il valore trovato nelle cellule trattate (+CLQ) rispetto a quello trovato nelle cellule non trattate (-CLQ).

L'aumento di PINK1 indotto da Cloroquina è quasi nullo nelle cellule 0% e 70%, mentre è statisticamente aumentato nelle cellule 80% e 99% mutate ($p=0.000$), pur rimanendo in quest'ultime cellule un valore molto ridotto rispetto ai controlli.

Considerazioni PINK1 muscolo: PINK1 è più espressa nei ibridi eteroplasmici rispetto ai wild type. Interessante è il fatto che tale aumento non determina un incremento di PINK1 a livello di mitocondri valutato con western blot, dove la proteina è significativamente diminuita rispetto ai controlli. Poiché PINK1 è sensore del danno mitocondriale si può affermare che nei ibridi eteroplasmici si ha una minor induzione della mitofagia.

Confronto PINK1 polmone/PINK1 muscolo: Complessivamente l'espressione genica di PINK1 risulta aumentata, in modo statisticamente significativo, nei ibridi eteroplasmici con diverso grado di mutazione sia polmonari che muscolari rispetto ai controlli omoplasmici 0% mutati. A livello mitocondriale abbiamo trovato una notevole differenza nella quantità di proteina tra ibridi di polmone e muscolo. Infatti nel muscolo i ibridi omoplasmici RD 0% hanno una notevole quantità di PINK1 mitocondriale, mentre la quantità di proteina cala notevolmente nei RD eteroplasmici, indice di una scarsa mitofagia in presenza di mutazione MELAS. All'opposto invece nei ibridi polmonari di controllo PINK1 è significativamente ridotta rispetto ai ibridi 70% mutati e l'incremento di PINK1 è significativo dopo l'aggiunta di Cloroquina. I dati suggeriscono un aumento della mitofagia nei B2 mutati che probabilmente determina una rimozione dei mitocondri alterati nelle cellule polmonari.

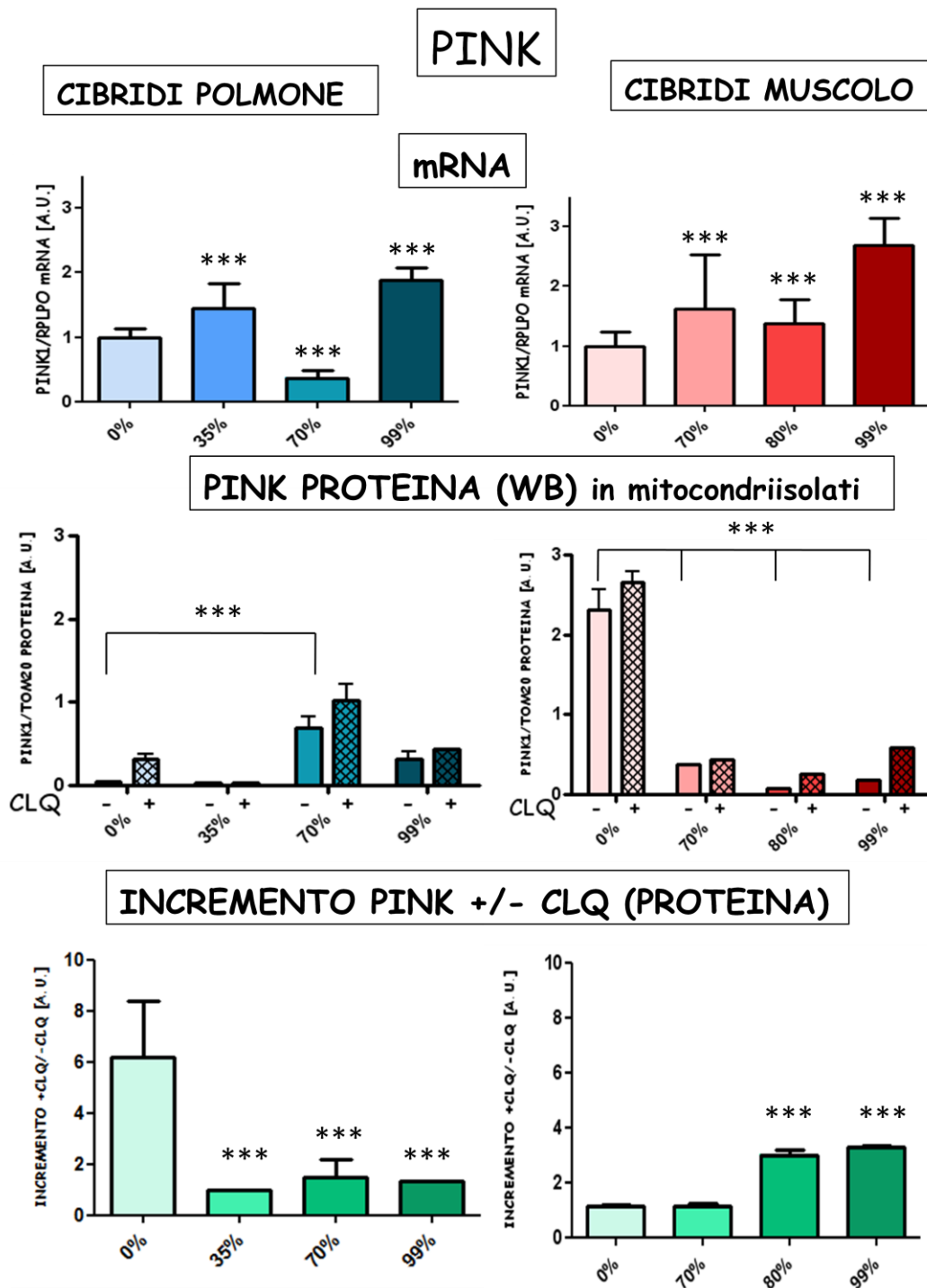


Figura 27: PINK è stata valutata come mRNA (espressione RT-PCR), che come quantità di proteina (Western Blot) sia in cibridi trattati con Cloroquina 50µM per 6 ore (+) che non trattati (-) ed è stato valutato l'incremento inteso come rapporto tra cellule trattate e non trattate (+/-). I cibridi di controllo sono 0% mentre per il polmone i cibridi eteroplasmici hanno una percentuale di mutazione del 35% -70% e 99% mentre nel muscolo del 70%-80 e 99%.

4.2.3.3 Parkin nel polmone

Espressione genica: i livelli di mRNA di Parkin sono stati quantificati con Real-time PCR. I valori di mRNA di Parkin sono stati normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale).

La media dei valori ottenuti nei tre controlli B20% A-B-C è stata considerata come il 100% d'espressione. I valori trovati nei ibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

I risultati mostrano un aumento d'espressione nei ibridi B235%-70%-99% di mutazione. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con $p=0.0355$ per i ibridi B2 35% e $p=0,00$ per i ibridi B270% e 99% mutati.

Quantità di proteina: la quantità proteica di Parkin è stata analizzata con Western Blot sui mitocondri isolati delle cellule, i valori ottenuti sono stati normalizzati con TOM, dato che questa proteina è poco presente e risulta difficilmente rilevabile sul lisato cellulare totale. L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3.

Il valore medio ottenuto nei tre controlli B20% A-B-C è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei ibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

La quantità di Parkin mitocondriale è notevolmente aumentata del 200% e 150% rispettivamente nei ibridi B2 35% e 70% mutati rispetto al controllo 0%. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con $p=0.000$ per i ibridi con il 35% e 70% di mtDNA mutato.

Tutti i ibridi B2 sono stati trattati in parallelo con Cloroquina 50 μ M per 6 ore. È stato quindi valutato per ogni linea cellulare il rapporto tra il valore trovato nelle cellule trattate (+CLQ) rispetto a quello trovato nelle cellule non trattate (-CLQ).

I risultati mostrano un aumento di Parkin in tutte le cellule trattate con cloroquina, quest'aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo per i ibridi B299% mutati con $p=0.000$.

Considerazioni Parkin polmone: l'espressione genica di Parkin aumenta nei ibridi eteroplasmici rispetto ai wild type. Anche la proteina rilevata con western blot aumenta nei ibridi eteroplasmici, eccetto che nei 99% mutati, rispetto ai 0%. Questi dati indicano una intensa mitofagia nei ibridi mutati e confermano i dati ottenuti con PINK1.

4.2.3.4 Parkin nel muscolo

Espressione genica: i livelli di mRNA di Parkin sono stati quantificati con Real-time PCR. I valori di mRNA di Parkin sono stati normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale).

La media dei valori ottenuti nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stata considerata come il 100% d'espressione mentre i valori trovati nei ibridi: 70%-80%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

I risultati evidenziano una diminuzione dell'espressione nei ibridi muscolari eteroplasmici RD 70% e 80% mutati rispettivamente dell'86% e 52%. Questa riduzione è stata analizzata dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con $p=0,000$. Invece i ibridi con il 99% di DNA mitocondriale mutato hanno un'espressione genica simile a quella dei controlli.

Quantità proteica: la quantità proteica di Parkin è stata analizzata con Western Blot sui mitocondri isolati delle cellule, i valori ottenuti sono stati normalizzati con TOM, dato che questa proteina è poco presente e risulta difficilmente rilevabile sul lisato cellulare totale. L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3. Il

valore medio ottenuto nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei ibridi: RD70%-80%-99%mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

Abbiamo osservato una assenza di proteina livello di mitocondri nei ibridi RD 70%-80%-99% mutati rispetto ai controlli. Il dato è ovviamente risultatostatisticamente significativo con $p=0.000$ per tutti i ibridi eteroplasmici RD 70%-80%-99% mutati.

Importante, nei ibridi eteroplasmici mutati 70% e 80% l'assenza di proteina è stata osservata anche nelle cellule trattate con Cloroquina. In linea con l'espressione genica di Parkin i ibridi omoplasmici di controllo WT 0% hanno una buona quantità di proteina che rimane inalterata dopo l'aggiunta di Cloroquina.

Confronto Parkin polmone/Parkin muscolo: questa proteina, che permette, in collaborazione con PINK1, di dare inizio alla mitofagia, mostra un comportamento opposto tra i ibridi con background polmonare e muscolare. I livelli d'espressione genica infatti aumentano significativamente nei ibridi polmonari con mutazione rispetto ai controlli senza mtDNA mutato ma diminuiscono nei ibridi muscolari. A conferma di questi risultati anche la quantizzazione proteica di Parkin, ottenuta con western blot, mostra un trend diverso nei due gruppi di ibridi considerati. Si osserva infatti un aumento della proteina mitocondriale nei ibridi eteroplasmici polmonari mentre la proteina risulta assente nei ibridi eteroplasmici muscolari, mentre questa è presente nei ibridi di controllo di muscolo. Questo dato evidenzia come la mitofagia sia presente e attiva nelle cellule polmonari che hanno il mtDNA mutato a differenza di quelle muscolari ed è in linea con quanto osservato per PINK1.

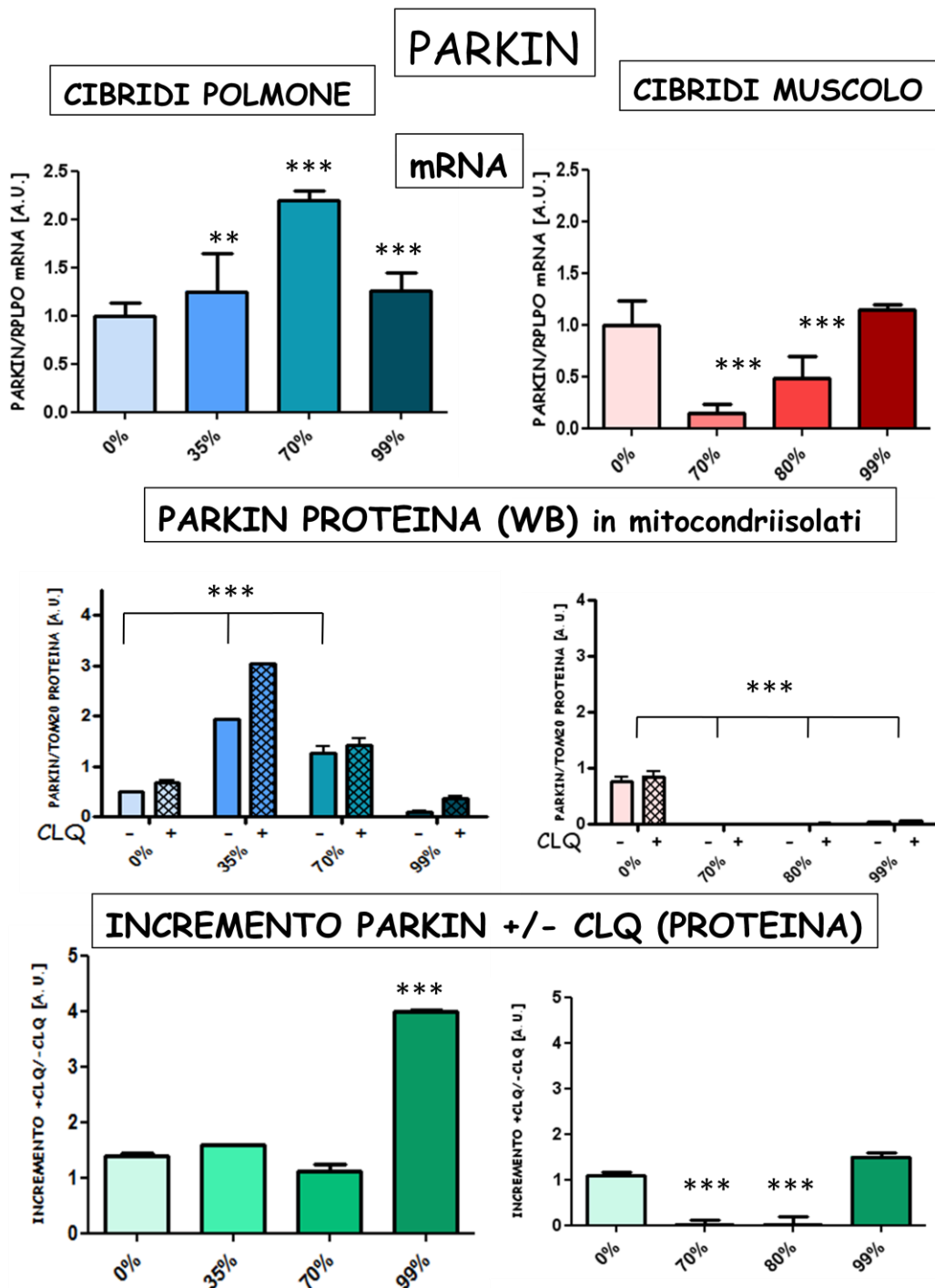


Figura 28: Parkin è stata valutata come mRNA (espressione RT-PCR), che come quantità di proteina (Western Blot) sia in cibridi trattati con Cloroquina 50µM per 6 ore (+) che non trattati (-) ed è stato valutato l'incremento inteso come rapporto tra cellule trattate e non trattate (+/-). I cibridi di controllo sono 0% mentre per il polmone i cibridi eteroplasmici hanno una percentuale di mutazione del 35% -70% e 99% mentre nel muscolo del 70%-80 e 99%.

4.2.4 BNIP3

La mitofagia, intesa come sistema selettivo di rimozione dei mitocondri alterati, può essere indotta non solo attraverso la via PINK1/Parkin mediata ma anche grazie all'attivazione di due recettori mitocondriali: Nix e BNIP3. Tali recettori, attivata la mitofagia, reclutano LC3 e mediano così il legame con il nascente autofagosoma. La dimerizzazione di questi recettori può aumentare la loro capacità d'interazione con LC3; contemporaneamente BNIP3 e Nix interagiscono con Bcl-2/Bcl-XLrilasciando Beclin che, una volta libero, è in grado di attivare il macchinario autofagico di base per formare gli autofagosomi. Quindi BNIP3, recettore mitocondriale coinvolto direttamente nella mitofagia, può essere considerato un indicatore della stessa.

4.2.4.1 BNIP3 nel polmone

Espressione genica: i livelli di mRNA di BNIP3 sono stati quantificati con Real-time PCR e normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale). La media dei valori ottenuti nei tre controlli B2 0% A-B-C è stata considerata come il 100% d'espressione. I valori trovati nei cibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

In linea con quanto osservato con Parkin nei cibridi B2 70%-99% mutati è presente un aumento d'espressione dell'84% e 31% rispetto ai controlli, che è statisticamente significativo con $p=0.000$ solo per il valore trovato nei cibridi B2 70%. I cibridi al 35% di mutazione invece mostrano un decremento del 36% rispetto ai controlli (statisticamente significativo con $p=0,000$).

Quantità di proteina: anche la quantità proteica di BNIP3 è stata analizzata con Western Blot sui mitocondri isolati delle cellule, i valori ottenuti sono stati normalizzati con TOM, L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3.

Il valore medio ottenuto nei tre controlli B2 0% A-B-C è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei cibridi: 35%-70%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

Si è osservato un aumento di BNIP3 del 220% nei mitocondri dei cibridi B2 70% mutati rispetto ai cibridi di controllo senza mutazione. Questo aumento è stato analizzato dal test t-Student ed è risultato statisticamente significativo con $p=0.007$. Tutti i cibridi B2 sono stati trattati in parallelo con Cloroquina $50\mu\text{M}$ per 6 ore. È stato quindi valutato per ogni linea cellulare il rapporto tra il valore trovato nelle cellule trattate (+CLQ) rispetto a quello trovato nelle cellule non trattate (-CLQ). In tutte le cellule trattate con Cloroquina, non si sono osservati grandi aumenti nella quantità proteica di BNIP3 rispetto a quelle non trattate. Solo i cibridi eteroplasmici B235% con Cloroquina mutati avevano un incremento di BNIP3 superiore ai controlli. Tale risultato è stato analizzato con il test t-Student e l'aumento considerato è risultato statisticamente significativo con un $p=0,004$.

Considerazioni BNIP3 polmone: l'espressione genica e il livello proteico di BNIP3 tendono ad aumentare al crescere della percentuale di mutazione, con un picco massimo nei cibridi eteroplasmici con 70% di mutazione. L'aggiunta di Cloroquina mostra un incremento considerevole della proteina esclusivamente che sui cibridi eteroplasmici al 35%.

4.2.4.2 BNIP3 nel muscolo

Espressione genica: i livelli di mRNA di BNIP3 sono stati quantificati con Real-time PCR (guarda paragrafo XX). I valori di mRNA di BNIP3 sono stati normalizzati con il gene house-keeping RPLPO (fosfoproteina acida ribosomiale). La media dei valori ottenuti nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stata considerata come il 100% d'espressione

mentre i valori trovati nei cibridi: 70%-80%-99% mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

I risultati evidenziano un decremento del 32% e 34% dell'espressione nei cibridi al 70%-80% mutati, come osservato con l'espressione di Parkin. Questa diminuzione è stata analizzata dal test t-Student ed è risultata statisticamente significativa con $p=0,04$ nei cibridi al 70% e $p=0,016$ nei cibridi all'80%.

Livelli di proteina: la quantità proteica di BNIP3 è stata analizzata con Western Blot ed i valori ottenuti sono stati normalizzati con TOM. Anche in questo caso il dosaggio proteico è stato fatto su un lisato di mitocondri isolati. L'intensità delle bande è stata quantificata dal software Gel-Pro Analyser3.

Il valore medio ottenuto nei tre controlli WT0% 1-2-3 è stato considerato come il 100% di presenza proteica, mentre i valori trovati nei cibridi: RD70%-80%-99%mutati sono espressi come percentuale rispetto al valore medio dei controlli.

La quantità di proteina è ridotta in modo analogo nelle cellule con mutazione rispetto ai controlli. Tutti i cibridi RD sono stati trattati in parallelo con Cloroquina 50 μ M per 6 ore. E' stato quindi valutato per ogni linea cellulare il rapporto tra il valore trovato nelle cellule trattate (+CLQ) rispetto a quello trovato nelle cellule non trattate (-CLQ). E' stato riscontrato solo un piccolo aumento in seguito al trattamento di tutte le cellule con Cloroquina ma che non risulta essere statisticamente significativo.

Considerazioni BNIP3 muscolo: l'espressione genica di BNIP3 mostra una diminuzione nei cibridi eteroplasmici RD 70-80% mutati e a livello proteico la proteina non è molto presente. Considerando questi risultati nel loro insieme si può affermare che la mitofagia non sembra esser attivata attraverso la via del recettore mitocondriale BNIP3 nei cibridi di muscolo, ribadendo quanto osservato per PINK1 e Parkin .

Confronto BNIP3 polmone/BNIP3 muscolo: questa proteina permette, in collaborazione con Nix, di dare inizio alla mitofagia. Essa sembra essere più presente, sia come espressione che come proteina nei mitocondri dei ibridi eteroplasmici con background polmonare che nei ibridi mutati con background muscolare. Questo dato conferma ulteriormente quanto osservato con PINK1 e Parkin, indicando una maggiore mitofagia nelle cellule di polmone con mtDNA mutato rispetto a quelle di muscolo

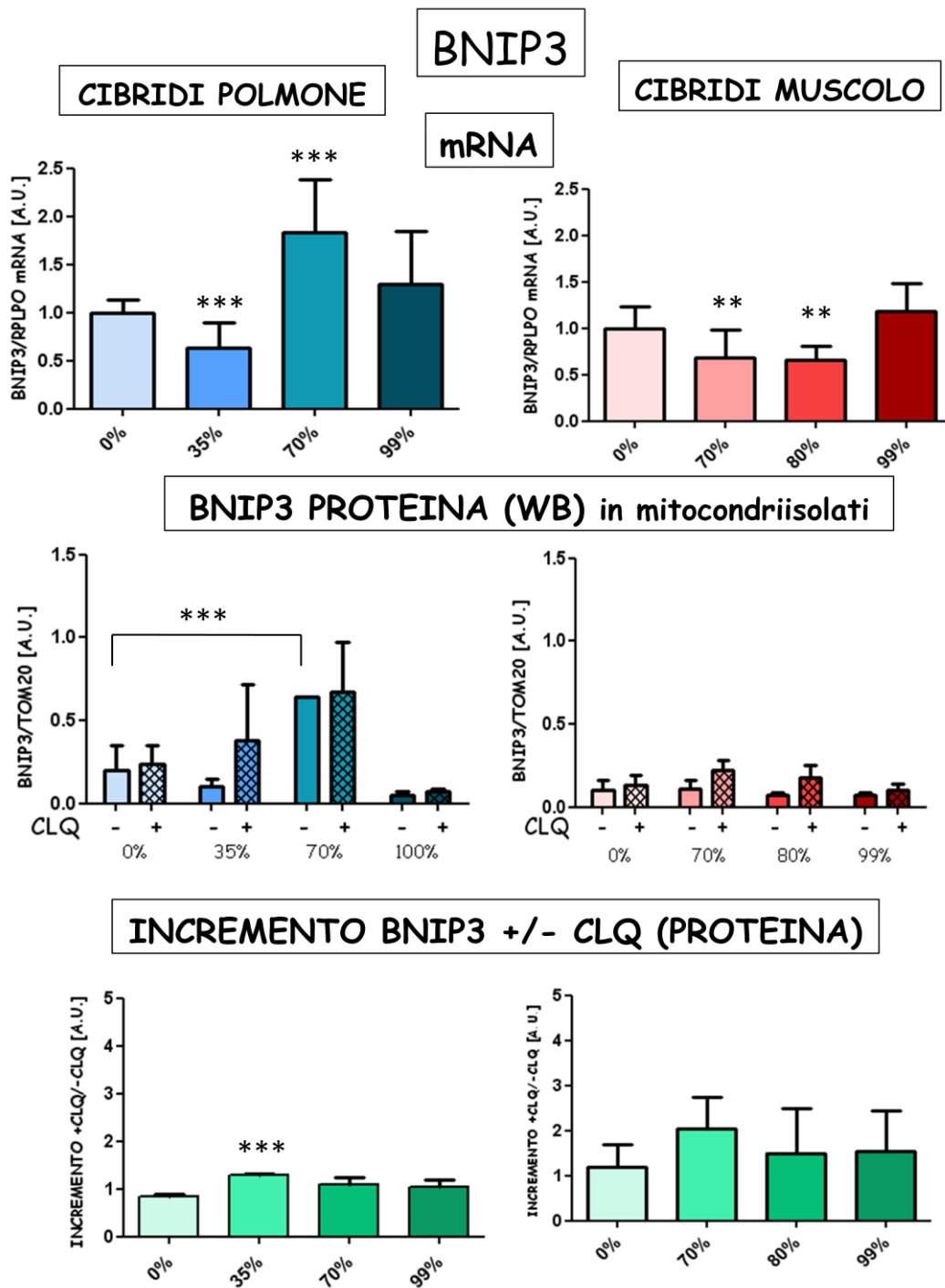


Figura 29:BNIP3 è stata valutata come mRNA (espressione RT-PCR), che come quantità di proteina (Western Blot) sia in cibridi trattati con Cloroquina 50µM per 6 ore (+) che non trattati (-) ed è stato valutato l'incremento inteso come rapporto tra cellule trattate e non tarattate (+/-). I cibridi di controllo sono 0% mentre per il polmone i cibridi eteroplasmici hanno una percentuale di mutazione del 35% -70% e 99% mentre nel muscolo del 70%-80 e 99%.

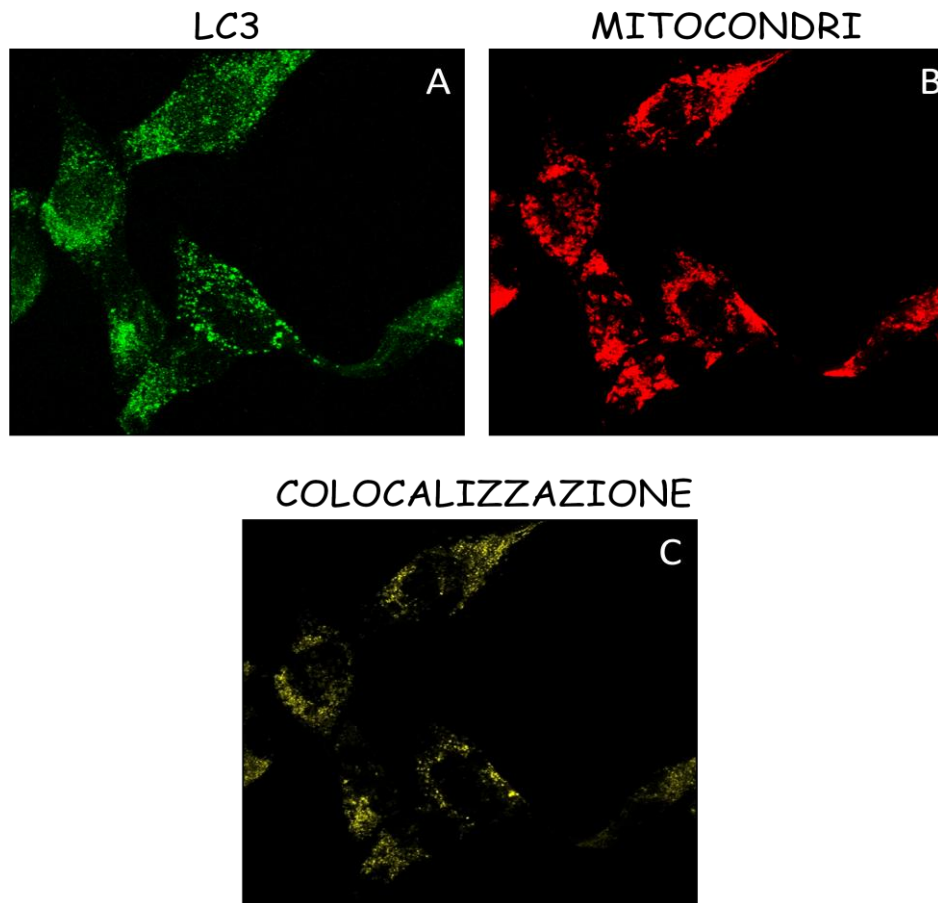
TERZA PARTE

4.3. AUTOFAGIA E MITOFAGIA CON IMAGING

La quantizzazione proteica, con western blot, di diverse proteine coinvolte nell'autofagia e nella mitofagia ha permesso di comprendere come funzionano questi due meccanismi di "auto pulizia cellulare" nelle due popolazioni di cibridi usate nel nostro studio. Per avvalorare i risultati ottenuti con western blot tutti i cibridi sono stati piastrati in doppio ed anche in questo caso, uno dei due campioni, è stato trattato con Cloroquina 50 μ M per 6 ore. Poi i vetrini sono stati fissati in paraformaldeide (guarda paragrafo 3.3.2). Sulle cellule fissate abbiamo osservato la presenza di LC3 con immunifluorescenza che la marcava di colore verde ed i mitocondri con un colorante vitale rosso (Mito Tracker Red). (guarda paragrafo 3.3.4).

Le immagini sono state prese al microscopio confocale Leica SP5 come stack di 0.5 μ m permettendo così, al termine della scansione, di ricostruire la cellula tridimensionalmente. Nelle immagini i dots di colore verde indicano gli autofagosomi mentre i dots di colore giallo corrispondono alla presenza di entrambi i segnali, rosso e verde, indicando che il mitocondrio (rosso) è fagocitato dall'autofagosoma (verde) e siamo quindi in presenza di mitofagia.

Tutte le immagini sono state analizzate con il programma Fiji (imagj) che permette di evidenziare bene i punti colorati nell'immagine acquisita eliminando i rumori di fondo e di calcolare su questa gli autofagosomi basandosi sul numero di pixel che corrispondono al colore verde. Per quanto riguarda il doppio segnale, quindi per ottenere il numero dei punti di colocalizzazione, si imposta il programma in modo che valuti esclusivamente i punti dove il segnale di fluorescenza risultava positivo, precisamente come risultato della moltiplicazione dei punti positivi sia con il verde (LC3) che con il rosso (i mitocondri).



Queste tre immagini ottenute al microscopio confocale Leica SP5 sono un esempio di come si possono osservare anche singolarmente le due colorazioni fatte sullo stesso vetrino, ossia la verde per evidenziare LC3 e quindi gli autofagosomi Fig A, e la rossa che identifica i mitocondri Fig B. Per la valutazione degli autofagosomi abbiamo fatto riferimento esclusivamente all'immagine con i dots verdi che da così il grado di autofagia presente nella cellula.

Come si può osservare l'immagine C con i dots gialli non è altro che la sovrapposizione delle due immagini, il software è in grado di leggere i pixel che si sovrappongono dandoci così questa terza immagine di colocalizzazione che rappresenta esattamente la colocalizzazione dei mitocondri e degli autofagosomi, quest'ultima diventerà l'indice di mitofagia presente nella cellula.

POLMONE

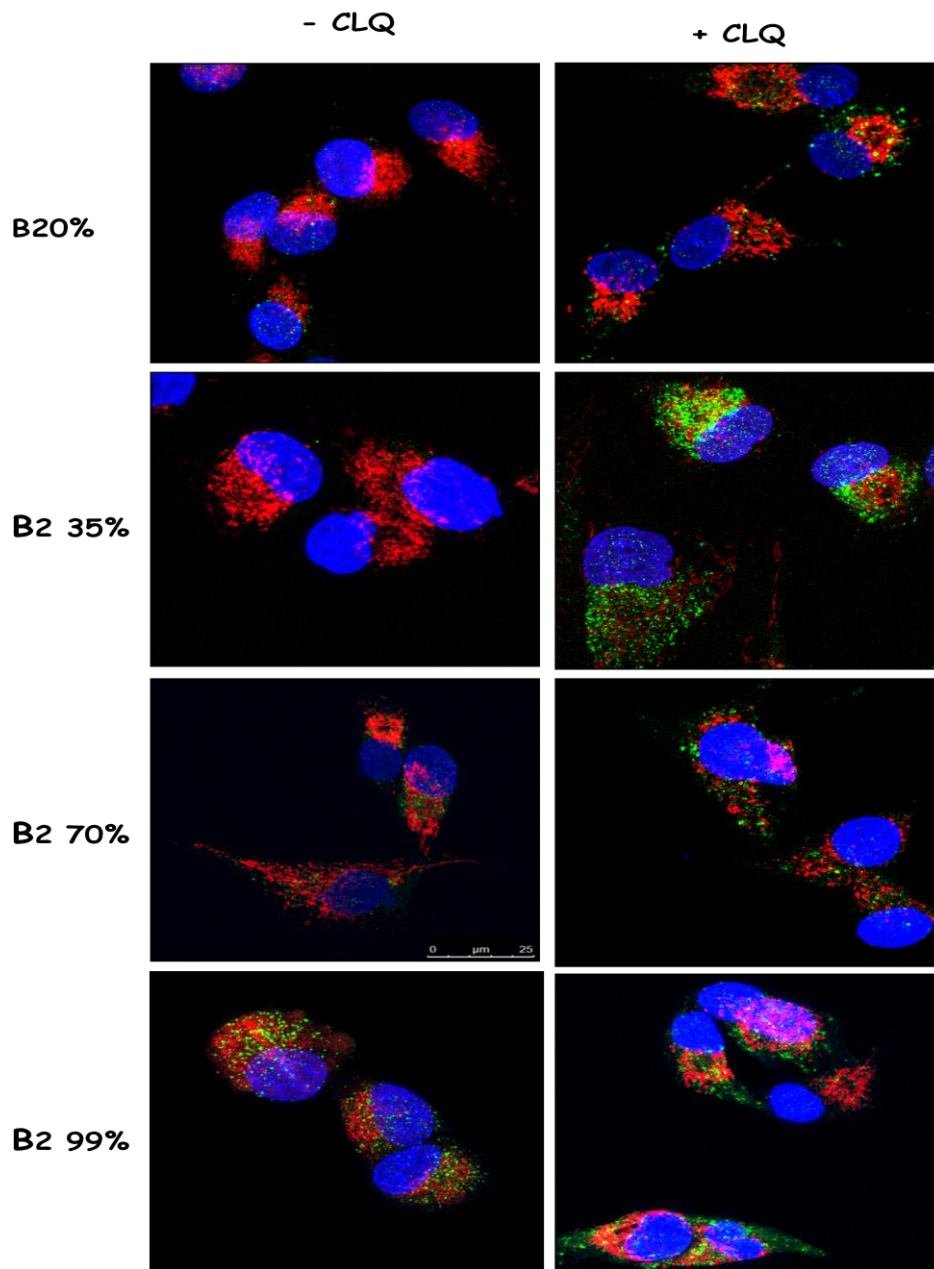


Figura 30: Immagini rappresentative di: A) Cibridi di controllo B2 0% mutati non trattati B) Cibridi di controllo B20% mutati trattati con cloroquina 50 μ M per 6 ore C) Cibridi eteroplasmici B2 35% mutati non trattati D) Cibridi eteroplasmici B2 35% mutati trattati cloroquina 50 μ M per 6 ore E) Cibridi eteroplasmici B2 70% mutati non trattati F) Cibridi eteroplasmici B2 70% mutati trattati cloroquina 50 μ M per 6 ore G) Cibridi eteroplasmici B2 99% mutati non trattati H) Cibridi eteroplasmici B2 99% mutati trattati cloroquina 50 μ M per 6 ore

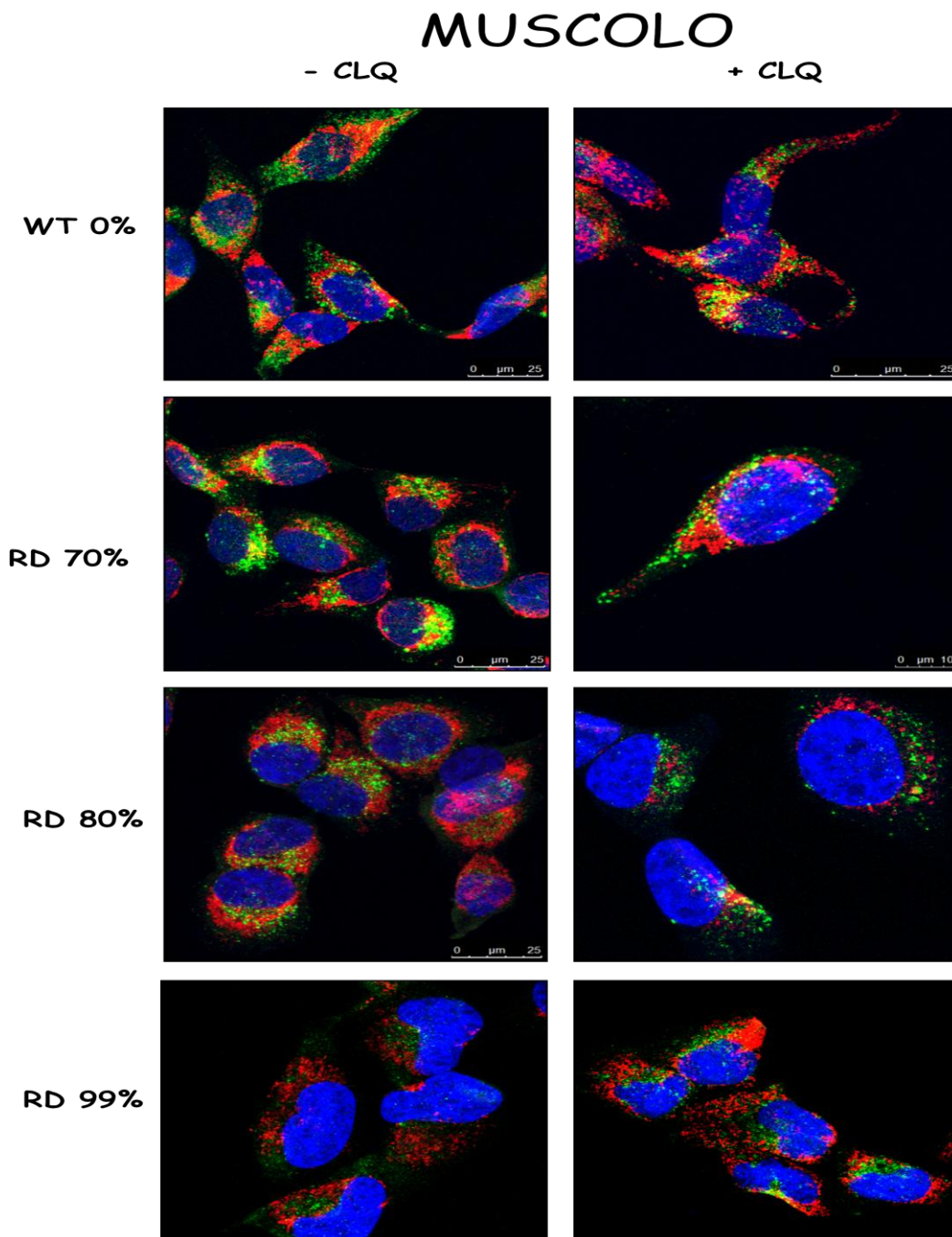


Figura 31: Immagini rappresentative di :A) Cibridi di controllo WT 0% mutati non trattati B) Cibridi di controllo WT 0% mutati trattati con cloroquina 50μM per 6 ore C) Cibridi eteroplasmici RD 70% mutati non trattati D) Cibridi eteroplasmici RD 70% mutati trattati cloroquina 50μM per 6 ore E) Cibridi eteroplasmici RD 80% mutati non trattati F) Cibridi eteroplasmici RD 80% mutati trattati cloroquina 50μM per 6 ore G) Cibridi eteroplasmici RD 99% mutati non trattati H) Cibridi eteroplasmici RD 99% mutati trattati cloroquina 50μM per 6 ore.

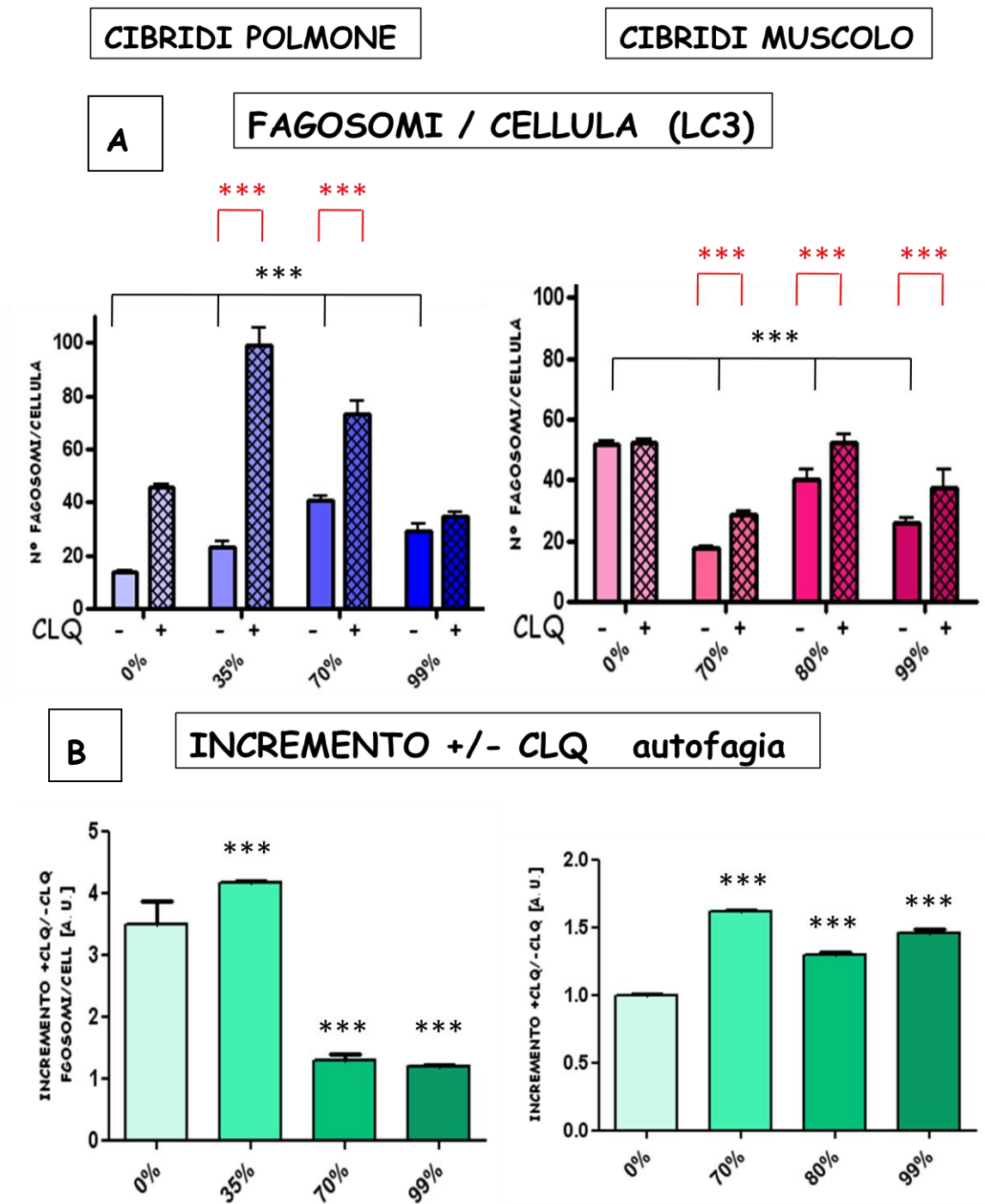


Figura 32:A) N° di fagosomi/cellula in cibridi di controllo omoplasmici 0% mutati e cibridi eteroplasmici POLMONE: 35%-70%-99% mutati; MUSCOLO 70%-80%-99% mutati, non trattati (-) e trattati con cloroquina 50µM per 6 ore (+). B) Incremento ottenuto dal rapporto tra il numero di fagosomi/ cellula dei cibridi trattati (+) e non trattati (-).

4.3.1 AUTOFAGIA

4.3.1.1 Autofagosomi polmone:

Tutte le immagini, prese come stack con il microscopio confocale, sono state analizzate singolarmente ed il numero di autofagosomi contati in ogni immagine è stato diviso per il numero di cellule presenti nell'immagine considerata, ottenendo così n° autofagosomi/cellula. E' possibile risalire al numero di cellule presenti all'interno dell'immagine grazie alla colorazione blu dei nuclei positivi al DAPI. Per ogni linea cellulare sono state analizzate almeno 40 cellule. Come si può osservare dal grafico, che sintetizza i risultati ottenuti dall'analisi di tutte le immagini considerate, il numero degli autofagosomi per cellula di polmone a livello basale aumenta del 71% nei ibridi 35% mutati, del 200% nei ibridi 70% mutati e 114% nei ibridi con il 99% di DNA mitocondriale mutato rispetto ai controlli. Tale aumento è stato analizzato con il test t-Student e l'aumento rispetto al controllo è risultato statisticamente significativo con un $p = 0,000$ per tutti e tre i ibridi eteroplasmici. Tutti i ibridi B235%-70%-99% mutati ed i tre controlli wild type B20% A-B-C sono stati trattati con Cloroquina 50 μ M per 6 ore. Sono stati così contati gli autofagosomi presenti nelle cellule non trattate (-CLQ) e trattate (+CLQ) e successivamente è stata valutata la variazione del numero di autofagosomi in relazione all'aggiunta di cloroquina. In seguito al trattamento si evidenzia un aumento del 236% nei ibridi 0% mutati e del 325%, 80%, 19% rispettivamente nei ibridi B235%-70%-99% mutati. Questo aumento del numero di fagosomi per cellula in seguito al trattamento con cloro china è stato analizzato con il test t-Student ed è risultato significativo con un $p=0,000$ per i ibridi di controllo 0% mutati e per i ibridi con il DNA mitocondriale mutato del 35%-e 70%.

4.3.1.2 Autofagosomi muscolo:

Tutte le immagini, prese come stack con il microscopio confocale, sono state analizzate singolarmente ed il numero di autofagosomi contati in ogni immagine è stato diviso per il numero di cellule presenti nell'immagine considerata, ottenendo così n° autofagosomi/cellula. E' possibile risalire al numero di cellule presenti all'interno dell'immagine grazie alla colorazione blu dei nuclei positivi al DAPI presente nel montante. Come si può osservare dal grafico, che sintetizza i risultati ottenuti dall'analisi di tutte le immagini considerate, il numero degli autofagosomi per cellula muscolare a livello basale diminuirà rispetto ai controlli del 66% nei ibridi 70% mutati, del 23% nei ibridi 80% mutati e 51% nei ibridi con il 99% di DNA mitocondriale mutato. Tale diminuzione è stata analizzata con il test t-Student e la riduzione del numero di autofagosomi rispetto al controllo è risultata statisticamente significativa con un $p = 0,000$ per tutti i ibridi eteroplasmici. Tutti i ibridi RD70%,80% e 99% mutati ed i tre controlli wild type WT0% 2-4-6 sono stati trattati con Cloroquina 50 μ M per 6 ore. Sono stati così contati gli autofagosomi presenti nelle cellule non trattate (-CLQ) e trattate (+CLQ) e successivamente è stata valutata la variazione del numero di autofagosomi in relazione all'aggiunta di Cloroquina. In seguito al trattamento non si evidenzia alcun aumento del numero di fagosomi per cellula nei ibridi 0% mutati ma un incremento del 63%, 30%, 48% rispettivamente nei ibridi RD 70%-80%-99% mutati. Questo aumento del numero di fagosomi per cellula in seguito al trattamento con cloroquina è stato analizzato con il test t-Student ed è risultato significativo con un $p=0,000$ per i ibridi con il DNA mitocondriale mutato del 70%,80% e 99%. L'incremento del numero di fagosomi per cellula dei controlli è stato confrontato con quello dei ibridi muscolari eteroplasmici, si è osservato un incremento del numero di fagosomi del 60% per i ibridi 70% mutati e del 30% e 40% rispettivamente per i ibridi mutati all'80% e 99%. Questo aumento è stato

analizzato con il test t-Student ed è risultato significativo con un $p=0,000$ per tutti i ibridi eteroplasmici.

4.3.1.3 Considerazioni autofagia polmone / muscolo

Dopo la quantizzazione delle proteine coinvolte nell'autofagia con western blot: LC3, p62, l'imaging ci ha dato la possibilità di confermare i risultati precedentemente ottenuti. Il calcolo degli autofagosomi nelle cellule con background polmonare e in quelle con background muscolare ha evidenziato che i ibridi di polmone eteroplasmici ne hanno, a livello basale, un numero pari o inferiore a quello dei ibridi di muscolo ma, dopo l'aggiunta di cloroquina, i ibridi polmonari mostrano un forte incremento nel numero di fagosomi per cellula, indice di un alto flusso autofagico. Interessante è notare che già nei ibridi di controllo 0% mutati si osserva un comportamento opposto tra ibridi muscolari e polmonari, il muscolo infatti ha un numero maggiore di autofagosomi già a livello basale ma il mancato incremento dopo l'aggiunta di cloroquina indica una autofagia bloccata, mal funzionante. Quindi tali risultati sembrano riconfermare il diverso comportamento di auto pulizia tra cellule muscolari e polmonari, queste ultime hanno un' autofagia che lavora in modo più efficiente e che cerca di ripulire più energicamente la cellula da organelli malfunzionanti.

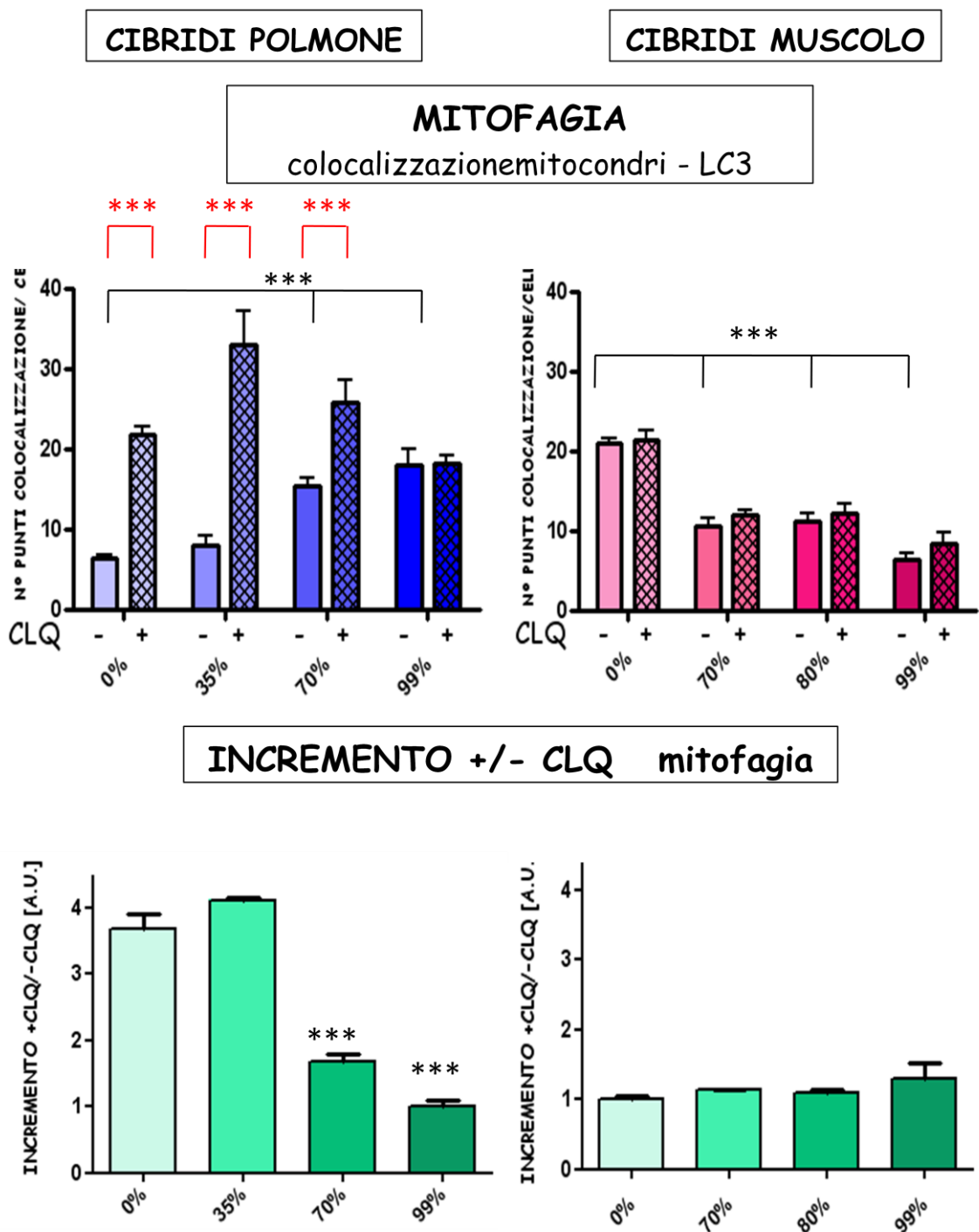


Figura 33:A) N° di punti di colocalizzazione/cellula in cibridi di controllo omoplasmici 0% mutati e cibridi eteroplasmici POLMONE: 35%-70%-99% mutati; MUSCOLO 70%-80%-99% mutati, non trattati (-) e trattati con Clorochina 50µM per 6 ore (+). B) Incremento ottenuto dal rapporto tra il numero di punti di colocalizzazione/ cellula dei cibridi trattati (+) e non trattati (-).

4.3.2 MITOFAGIA

4.3.2.1 Mitofagia polmone

Tutte le immagini utilizzate per il conteggio degli autofagosomi sono state utilizzate per analizzare la colocalizzazione degli stessi con i mitocondri. I punti di colocalizzazione sono stati considerati come indice di mitofagia cellulare.

Nei ibridi eteroplasmici B2 70% e 99% a livello basale i punti di colocalizzazione aumentano rispettivamente del 137% e del 176% rispetto ai controlli. Questo aumento è stato analizzato con il test t-Student e sono entrambi risultati statisticamente significativi con un $p=0,000$. Nelle cellule trattate con Cloroquina $50\mu\text{M}$ per 6 ore, l'incremento dei punti di colocalizzazione è del 236% nei controlli, e del 312% e 66% rispettivamente per i ibridi eteroplasmici al 35% e 70% di mutazione. L'incremento ottenuto con l'aggiunta di cloroquina nei ibridi eteroplasmici è stato paragonato all'incremento ottenuto dai ibridi di controllo e si è evidenziata una diminuzione del 54% e del 73% nei ibridi al 70% e 99% mutati che è risultata per entrambi statisticamente significativa con $p=0,000$.

Nel complesso l'istogramma, che sintetizza l'analisi delle immagini, evidenzia che i punti di colocalizzazione aumentano all'aumentare della percentuale di mutazione. Indice che nella cellula di polmone sia in atto una forte rimozione di mitocondri danneggiati.

4.3.2.2 Mitofagia muscolo

In modo analogo nelle immagini utilizzate per la conta degli autofagosomi del muscolo si è proceduto ad analizzare la colocalizzazione degli autofagosomi con i mitocondri, considerati come indice di mitofagia cellulare. L'istogramma in figura 4.3.4 evidenzia che i punti di colocalizzazione diminuiscono notevolmente del 49%, 47%, 70%, rispettivamente nei ibridi eteroplasmici RD70%, 80% e 99% mutati rispetto ai controlli. Questo decremento è stato analizzato con il test t-Student ed è risultato significativo con un $p=0,000$ per tutti e tre i ibridi considerati. Anche dopo trattamento con cloroquina i ibridi muscolari con mutazione non evidenziano un aumento di

mitofagia, a differenza di quanto osservato nel pomone. Questo indica un blocco della rimozione dei mitocondri alterati da parte dei ibridi con background muscolare.

4.3.2.3 Considerazioni mitofagia polmone / muscolo

Per validare ulteriormente i dati di mitofagia, ottenuti inizialmente con l'analisi biochimica-molecolare di Parkin, Pink e BNIP3, nei ibridi polmonari e muscolari abbiamo proceduto con l'osservazione morfologica e l'analisi di imaging, che nel complesso confermano quanto osservato in precedenza. La mitofagia aumenta progressivamente con l'aumentare della percentuale di mutazione nei ibridi con background polmonare, dove gli autofagosomi hanno una maggior tendenza a racchiudere i mitocondri per degradarli. Mentre la mitofagia diminuisce progressivamente con l'aumentare della mutazione nei ibridi muscolari. Infatti questi presentano una buona quantità di fagosomi, ma sembra che questi non svolgano una rimozione selettiva dei mitocondri, non supportando quindi lo smaltimento necessario dei mitocondri danneggiati. Questa osservazione può spiegare perché i ibridi di origine muscolare con il passare del tempo mostrano un aumento del DNA mitocondriale mutato mentre i ibridi polmonari pian piano riducono i mitocondri alterati favorendo l' mtDNA wild type.

5 DISCUSSIONE

5.1 Influenza della dinamica mitocondriale sulla segregazione

E' stato precedentemente visto che il background muscolare favorisce il mtDNA mutato e che la down regolazione di DRP1 e hFIS1, proteine della fissione mitocondriale, aumenta la fusione dei mitocondri e determinava l'aumento della proporzione del mtDNA mutato. Ci si è chiesto se promuovendo la fissione dei mitocondri, mediante down regolazione della proteina di fusione come la mitofusina 1 (Mfn1), si poteva ottenere l'effetto opposto: l'aumento della proporzione del mtDNA wild-type. L'ipotesi era che un aumento dei mitocondri frammentati avrebbe potuto favorire la eliminazione dei mitocondri danneggiati. La downregolazione di Mfn1 è stata ottenuta con successo in ibridi di muscolo con l'80% di mutazione. Sono stati ottenuti sei cloni con livelli molto bassi di Mtf1, dato confermato dalla morfologia mitocondriale dei cloni raccolti dopo selezione con igromicina. Nel complesso però non si è registrata una variazione della percentuale di mutazione del mtDNA in questi cloni. E' difficile spiegare il motivo di questo risultato. Possiamo elencare le seguenti ipotesi che dovranno essere validate:

- A. La mitofusina 1 ha una funzione ridondante nel meccanismo di fusione. Analoga funzione è svolta da mitofusina2 e OPA. La soppressione di Mfn1 può aumentare la frammentazione dei mitocondri ma non gli eventi di fusione che potrebbero procedere per l'attività delle altre due proteine. Ulteriori analisi sono necessarie per chiarire la espressione e la presenza proteica di OPA1 e Mtf2 nelle cellule con down regolate per Mtf1.

- B. Come specificato nel paragrafo successivo, nei ibridi eteroplasmici di muscolo è

ridotta la espressione di proteine chiave della mitofagia come BNIP3 e Parkin. E' quindi possibile che anche aumentando la frammentazione non sia efficace la rimozione di mitocondri alterati per una riduzione delle proteine necessarie allo svolgimento della mitofagia. Anche in questo caso ulteriori analisi sono necessarie per chiarire l' espressione e la presenza proteica di BNIP3 e Parkin nei mitocondri di questi cloni e per valutare la mitofagia a livello morfologico.

5.2 Caratterizzazione del potenziale autofagico e quantizzazione della mitofagia

I ibridi di polmone e muscolo presentano complessivamente un apparato autofagico e un flusso autofagico simile. I dati ottenuti con analisi biochimiche su LC3, p62 sono stati confermati con l'immunofluorescenza e imaging. Abbiamo trovato, pur con delle ovvie variazioni, una simile attività autofagica sia nei ibridi di polmone che in quelli muscolo. Inoltre abbiamo appurato che l'attività autofagica è poco variata al aumentare della percentuale di mutazione in entrambi i gruppi cellulari. In conclusione quindi non osserviamo una autofagia compromessa nelle cellule che privilegiano il mtDNA mutato come i ibridi eteroplasmici di muscolo con 70% e 80% di mutazione.

Molto interessanti sono invece i dati riguardanti la mitofagia o la degradazione selettiva dei mitocondri.

Nei ibridi eteroplasmici di polmone tutti i dati morfologici, molecolari e biochimici di PINK1, Parkin e BNIP3 concordano nell'indicare un aumento della mitofagia all'aumentare della percentuale di mutazione rispetto ai rispettivi controlli senza mtDNA mutato. In particolare c'è un significativo aumento del mRNA di PINK1, Parkin e BNIP3 con l'aumentare della percentuale di mutazione. Probabilmente per la presenza di cross-talk nucleo-mitocondri, che suggerisce la presenza di un segnale dai mitocondri affetti verso il nucleo. Sia la quantità di Parkin mitocondriale che la mitofagia rilevata mediante

imaging concordano nel indicare i cibridi di polmone con 35% di mutazione come quelli in cui è presente la massima attività mitofagica.

La mitofagia ha un andamento totalmente opposto nelle cellule di muscolo. Nei cibridi eteroplasmici muscolari con 70%, 80% e 99%, che ricordiamo hanno una autofagia attiva, solo metà degli autofagosomi sono colocalizzati con i mitocondri rispetto ai controlli. In linea con questo dato nei cibridi muscolari 70% e 80% mutati rispetto ai controlli c'è: (i) una riduzione significativa dell'mRNA di BNIP3 e Parkin; (ii) una notevole riduzione di PINK1 e l'assenza totale di Parkin nei mitocondri isolati sia in assenza che presenza di clorochina. Nell'insieme questi dati concordano nell'indicare una riduzione della mitofagia all'aumentare della percentuale di mutazione.

Per cui è possibile affermare che nel modello cellulare utilizzato la segregazione del mtDNA wild type è favorita nelle cellule di polmone grazie a una attiva mitofagia che rimuove i mitocondri alterati, mentre nelle cellule di muscolo osserviamo una drastica riduzione della mitofagia proprio nelle cellule che hanno un carico maggiore di mtDNA mutato. Quale sia il meccanismo molecolare alla base di questo fenomeno è difficile da spiegare. Un'ipotesi da testare potrebbe essere la seguente. Le cellule muscolari hanno una maggiore richiesta energetica di quelle di polmone. E' probabile quindi che le cellule muscolari privilegino la fusione dei mitocondri con alta percentuale di mutazione e non funzionanti, diluendo in questo modo la percentuale di mutazione di questi, per mantenere un network mitocondriale ottimale per la cellula. Questo processo impedisce però l'eliminazione autofagosoma-mediata del mitocondrio alterato. Questa ipotesi potrebbe spiegare la ridotta mitofagia osservata nelle cellule muscolari con elevata percentuale di mutazione rispetto alle 0% mutate. Interessante le proteine chiave della mitofagia come BNIP3 e Parkin sono diminuite anche a livello trascrizionale. Una successione di questi eventi comporterebbe alla fine un sensibile aumento della percentuale di mutazione che avviene nel background di muscolo. All'opposto nelle cellule di

polmone con mtDNA mutato è presente un incremento delle mitofagia, che probabilmente elimina in continuazione mitocondri con alteratopotenziale di membrana, non funzionanti. Da notare che nei cibridi eteroplasmici polmonari è aumentata a livello trascrizionale l'espressione di tutte le proteine chiave della mitofagia e che i mitocondri da eliminare sono rotondeggianti per eventi di fissione, quindi nelle cellule di polmone con mutazione dovrebbero essere più espresse le proteine di fissione mitocondraile DRP1 e hFIS1.

Quindi un aumento delle proteine di fusione nei mitocondri di muscolo e un aumento delle proteine di fissione nei mitocondri di polmone potrebbero validare questa ipotesi. La valutazione dello stato bioenergetico mitocondriale in cellule trattate con cloroquina potrebbe indicarci inoltre esiste una differenza quantitativa di mitocondri alterati destinati alla rimozione tra cellule eteroplasmiche di muscolo e di polmone.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488
2. Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-1481
3. Ernster L, Schatz G (1981) Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91:227s-255s
4. Duchon MR (2004) Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25:365-451
5. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13:1396-1402
6. Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25:319-324
7. Scheffler IE (2001) Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* 49:3-26
8. Smeitink J, van den HL, DiMauro S (2001) The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2:342-352
9. Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 2:117-126
10. Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:1488-1493
11. Di DS (2000) Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 23:247-263
12. Poyton RO, McEwen JE (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* 65:563-607
13. Zeviani M, Di DS (2004) Mitochondrial disorders. *Brain* 127:2153-2172
14. Nass MM (1966) The circularity of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56:1215-1222
15. Goto Y (2001) Clinical and molecular studies of mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis* 24:181-188
16. Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 88:41-56
17. Lightowers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N (1997) Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet* 13:450-455
18. Jacobs LJ, de WG, Geraedts JP, de C, I, Smeets HJ (2006) The transmission of OXPHOS disease and methods to prevent this. *Hum Reprod Update* 12:119-136
19. Ames BN (1989) Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* 7:121-128
20. Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6465-6467

21. Shibata T, Ling F (2007) DNA recombination protein-dependent mechanism of homoplasmy and its proposed functions. *Mitochondrion* 7:17-23
22. Poulton J, Marchington DR (2002) Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications. *Reproduction* 123:751-755
23. Battersby BJ, Loredó-Osti JC, Shoubridge EA (2003) Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nat Genet* 33:183-186
24. Yoneda M, Chomyn A, Martinuzzi A, Hurko O, Attardi G (1992) Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11164-11168
25. Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ (1995) Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6562-6566
26. Ashley MV, Laipis PJ, Hauswirth WW (1989) Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res* 17: 7325-7331
27. Olivo PD, Van de Walle MJ, Laipis PJ, Hauswirth WW (1983) Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. *Nature* 306: 400-402.
28. Jansen RP, de BK (1998) The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol* 145: 81-88.
29. Krakauer DC, Mira A (1999) Mitochondria and germ-cell death. *Nature* 400: 125-126.
30. Liqin Cao, Hiroshi Shitara, Michihiko Sugimoto, Jun-Ichi Hayashi, Kuniya Abe, Hiromichi Yonekawa (2009) New evidence confirms that the mitochondrial bottleneck is generated without reduction of mitochondrial DNA content in early primordial germ cells of mice
31. Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, et al. (2007) The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* 39: 386-390
32. Steven Z. DeLuca and Patrick H. O'Farrell (2012) Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development. *Developmental Cell* 22, 660-668
33. Tokuyasu, K.T., Peacock, W.J., and Hardy, R.W. (1972a). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 124, 479-506.
34. Tokuyasu, K. (1974). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* 1: III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Exp. Cell Res.* 84, 239-250.
35. Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
36. Sligh, J.E., Levy, S.E., Waymire, K.G., Allard, P., Dillehay, D.L., Nusinowitz, S., Heckenlively, J.R., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2000). Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14461-14466.

37. Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 462–467.
38. Mark S. Sharpley, Christine Marciniak, Kristin Eckel-Mahan, Meagan McManus, Marco Crimi, Katrina Waymire, Chun Shi Lin, Satoru Masubuchi, Nicole Friend, Maya Koike, Dimitra Chalkia Grant MacGregor, Paolo Sassone-Corsi, and Douglas C. Wallace (2012). Heteroplasmy of Mouse mtDNA Is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition. *Cell* 151, 333–343
39. Phillips, D., Covian, R., Aponte, A.M., Glancy, B., Taylor, J.F., Chess, D., and Balaban, R.S. (2012). Regulation of oxidative phosphorylation complex activity: effects of tissue-specific metabolic stress within an allometric series and acute changes in workload. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302, R1034–R1048.
40. Mark S. Sharpley, Christine Marciniak, Kristin Eckel-Mahan, Meagan McManus, Marco Crimi, Katrina Waymire, Chun Shi Lin, Satoru Masubuchi, Nicole Friend, Maya Koike, Dimitra Chalkia Grant MacGregor, Paolo Sassone-Corsi, and Douglas C. Wallace (2012). Heteroplasmy of Mouse mtDNA Is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition. *Cell* 151, 333–343
41. Etain, B., Milhiet, V., Bellivier, F., and Leboyer, M. (2011). Genetics of circadian rhythms and mood spectrum disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21 (Suppl 4), S676–S682.
42. Weiwei Fan, Katrina G. Waymire, Navneet Narula, Peng Li, Christophe Rocher, Pinar E. Coskun, Mani A. Vannan, Jagat Narula, Grant R. MacGregor, Douglas C. Wallace (2008). A Mouse Model of Mitochondrial Disease Reveals Germline Selection Against Severe mtDNA Mutations. *Vol. 319 no. 5865 pp. 958-962*
43. Atsuko Kasahara, Kaori Ishikawa, Makiko Yamaoka, Masahito Ito, Naoki Watanabe, Miho Akimoto, Akitsugu Sato, Kazuto Nakada, Hitoshi Endo, Yoko Suda, Shinichi Aizawa and Jun-ichi Hayashi, (2006). Generation of trans-mitochondrial mice carrying homoplasmic mtDNAs with a missense mutation in a structural gene using ES cells. *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol. 15, No. 6
44. Douglas C. Wallace. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu Rev Genet.* 2005 ; 39: 359
45. Yoneda M, Miyatake T, Attardi G (1994) Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol Cell Biol* 14:2699-2712
46. Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto YI, Nonaka I, Hayashi JI (2001) Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 7:934-940
47. Zeviani M, Carelli V (2007) Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 20:564-571
48. Zeviani M, Spinazzola A, Carelli V (2003) Nuclear genes in mitochondrial disorders. *Curr Opin Genet Dev* 13:262-270
49. Zeviani M, Carelli V (2003) Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 16:585-594
50. Mollers M, Maniura-Weber K, Kiseljakovic E, Bust M, Hayrapetyan A, Jaksch M, Helm M, Wiesner RJ, von Kleist-Retzow JC (2005) A new mechanism for mtDNA pathogenesis: impairment of post-transcriptional maturation leads to severe depletion of mitochondrial

tRNA^{Ser}(UCN) caused by T7512C and G7497A point mutations. *Nucleic Acids Res* 33:5647-5658

51. Mita S, Schmidt B, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E (1989) Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9509-9513
52. Barkovich AJ, Good WV, Koch TK, Berg BO (1993) Mitochondrial disorders: analysis of their clinical and imaging characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* 14:1119-1137
53. Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC (1989) Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7952-7956
54. Shanske S, Tang Y, Hirano M, Nishigaki Y, Tanji K, Bonilla E, Sue C, Krishna S, Carlo JR, Willner J, Schon EA, DiMauro S (2002) Identical mitochondrial DNA deletion in a woman with ocular myopathy and in her son with pearson syndrome. *Am J Hum Genet* 71:679-683
55. Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA (1995) Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet* 57:239-247
56. Finsterer J (2007) Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA^{Leu}(UUR) mutation. *Acta Neurol Scand* 116:1-14
57. Hirano M, Ricci E, Koenigsberger MR, Defendini R, Pavlakis SG, DeVivo DC, DiMauro S, Rowland LP (1992) Melas: an original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscul Disord* 2:125-135
58. Dubeau F, De SN, Zifkin BG, Arnold DL, Shoubridge EA (2000) Oxidative phosphorylation defect in the brains of carriers of the tRNA^{Leu}(UUR) A3243G mutation in a MELAS pedigree. *Ann Neurol* 47:179-185
59. Chinnery PF, Howell N, Lightowers RN, Turnbull DM (1997) Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain* 120 (Pt 10):1713-1721
60. Goto Y, Nonaka I, Horai S (1990) A mutation in the tRNA^(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348:651-653
61. DiMauro S (2004) Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1658:80-88
62. Bentlage HA, Attardi G (1996) Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived transmitochondrial cell lines carrying the 3243 mutation associated with the MELAS encephalomyopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number. *Hum Mol Genet* 5:197-205
63. Park H, Davidson E, King MP (2003) The pathogenic A3243G mutation in human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) decreases the efficiency of aminoacylation. *Biochemistry* 42:958-964
64. Chomyn A, Enriquez JA, Micol V, Fernandez-Silva P, Attardi G (2000) The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J Biol Chem* 275:19198-19209

65. Jacobs HT, Holt IJ (2000) The np 3243 MELAS mutation: damned if you aminoacylate, damned if you don't. *Hum Mol Genet* 9:463-465
66. Suzuki T, Suzuki T, Wada T, Saigo K, Watanabe K (2002) Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J* 21:6581-6589
67. Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G (1992) MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4221-4225
68. Lehtinen SK, Hance N, El MA, Juhola MK, Juhola KM, Karhu R, Spelbrink JN, Holt IJ, Jacobs HT (2000) Genotypic stability, segregation and selection in heteroplasmic human cell lines containing np 3243 mutant mtDNA. *Genetics* 154:363-380
69. King MP, Attardi G (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246:500-503
70. King MP, Attardi G (1996) Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 264:304-313
71. Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G (1994) Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 54:966-974
72. Khan SM, Smigrodzki RM, Swerdlow RH (2007) Cell and animal models of mtDNA biology: progress and prospects. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C658-C669
73. Vergani L, Prescott AR, Holt IJ (2000) Rhabdomyosarcoma rho(0) cells: isolation and characterization of a mitochondrial DNA depleted cell line with 'muscle-like' properties. *Neuromuscul Disord* 10:454-459
74. Annett Koch, Yisang Yoon, Nina A. Bonekamp, Mark A. McNiven and Michael Schrader(2005), A Role for Fis1 in Both Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 16, 5077–5086
75. Dong-Hyung Cho, Tomohiro Nakamura, Jianguo Fang, Piotr Cieplak, Adam Godzik, Zezong Gu and Stuart A. Lipton (2009). S-Nitrosylation of Drp1 Mediates β -Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science* 324(5923): 102
76. Dominic I. James, Philippe A. Parone, Yves Mattenberger, and Jean-Claude Martinou(2003). A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine hFis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 278, No. 38, pp. 36373–36379
77. Yisang Yoon, Eugene W. Krueger, Barbara J. Oswald, and Mark A. McNiven (2003). The Mitochondrial Protein hFis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-Like Protein DLP1. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, p. 5409–5420 Vol. 23, No. 15

78. Chuang-Rung Chang, Craig Blackstone (2010). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. Volume 1201, *Mitochondrial Research in Translational Medicine* pages 34–39
79. Ansgar Santel (2006). Get the balance right: Mitofusins roles in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (2006) 490–499
80. Hiromi Sesaki and Robert E. Jensen (2004). Ugo1p Links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for Mitochondrial Fusion. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 279, No. 27, pp. 28298–28303
81. Emily M. Coonrod, Mary Anne Karren and Janet M. Shaw(2007). Ugo1p Is a Multipass Transmembrane Protein with a Single Carrier Domain Required for Mitochondrial Fusion. *Traffic*; 8: 500–511
82. Elena Smirnova, Lorena Griparic, Dixie-Lee Shurland and Alexander M. van der Blik (2001) Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 12, 2245–2256
83. Sanja Sever, Amy B. Muhlberg & Sandra L. Schmid (1999) Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 398, 481-486
84. A.D. Mozdy, J.M. McCaffery and J.M. Shaw (2000). Dnm1p GTPase-mediated Mitochondrial Fission Is a Multi-step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p. *The Journal of Cell Biology*, Volume 151, Number 2, pp367–379
85. Ansgar Santel and Margaret T. Fuller (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science* 114, 867-874
86. Manuel Rojo, Frédéric Legros, Danielle Chateau and Anne Lombès (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *Journal of Cell Science* 115, 1663-1674
87. Edith D. Wong, Jennifer A. Wagner, Sidney V. Scott, Voytek Okreglak, Timothy J. Holewinski, Ann Cassidy-Stone and Jodi Nunnari (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *The Journal of Cell Biology*, Volume 160, Number 3, February 3, 2003 303–311
88. Masaaki Satoha, Toshiro Hamamoto, Norimasa Seo, Yasuo Kagawa, Hitoshi Endo (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. Volume 300, Issue 2, Pages 482–493
89. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160:189-200
90. Cipolat S, Martins de BO, Dal ZB, Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15927-15932
91. Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, Ogawa M, Ishizaki Y, Kitamura T, Shozawa Y, Hayasaka K (2005) Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet* 116:23-27

92. Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J (2007) Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 27:422-430
93. Detmer SA, Chan DC (2007) Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* 176:405-414
94. Cereghetti GM, Scorrano L (2006) The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene* 25:4717-4724
95. Youle RJ, Karbowski M (2005) Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:657-663
96. Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ (2002) Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159:931-938
97. Russell L. Deter and Christian De Duve (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol.* 33:437-449
98. Hitoshi Nakatogawa, Kuninori Suzuki, Yoshiaki Kamada & Yoshinori Ohsumi(2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 458-467
99. Elizabeth L. Axe, Simon A. Walker , Maria Manifava , Priya Chandra , H. Llewelyn Roderick , Anja Habermann , Gareth Griffiths , and Nicholas T. Ktistakis(2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* Vol. 182 No. 4 685–701
100. Anne Simonsen and Sharon A. Tooze (2009).Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* Vol. 186 No. 6 773–782
101. Noboru Mizushima(2007). Autophagy: process and function. *GENES & DEVELOPMENT* 21:2861–2873
102. Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ. The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2008;19:668–81
103. Cheong H, Yorimitsu T, Reggiori F, Legakis JE, Wang CW, Klionsky DJ. Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response. *Mol Biol Cell* 2005;16:3438–53
104. Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y. Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell* 2005;16:2544–53.
105. Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T, Ohsumi Y. Organization of the pre autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 2008;19:2039–50.
106. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, et al. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 2008;181:497–510
107. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009;20:1992–2003.

108. Chan EYW, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 2009;29:157–71
109. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009;20:1981–91.
110. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 2000;150:1507–13
111. Chang YY, Neufeld TP. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Mol Biol Cell* 2009;20:2004–14
112. Scott SV, Guan J, Hutchins MU, Kim J, Klionsky DJ. Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol Cell* 2001;7:1131–41
113. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005;171:603–14.
114. Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:20567–74
115. Noda NN, Kumeta H, Nakatogawa H, Satoo K, Adachi W, et al. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells* 2008;13:1211–18.
116. Zhang Y, Yan L, Zhou Z, Yang P, Tian E, et al. SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans*. *Cell* 2009;136:308–21
117. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 2008;19:5360–72
118. Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2001;152:519–30.
119. Nice DC, Sato TK, Stromhaug PE, Emr SD, Klionsky DJ. Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J Biol Chem* 2002;277:30198–207
120. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 2003;116:1679–88
121. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J* 1999;18:3888–96
122. Juhasz G, Neufeld TP. Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol* 2006;4:e36
123. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 2000;151:263–76

124. Jager S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 2004;117:4837–48
125. Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 2005;1:84–91
126. Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* 2006;17:5094–104
127. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006; 441:880–884
128. Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M, Kimchi A. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol Cell*. 2006; 22:463–475
129. Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M, Peter M. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat Cell Biol*. 2008; 10:602–610
130. MacIntosh GC, Bassham DC. The connection between ribophagy, autophagy and ribosomal RNA decay. *Autophagy*. 2011; 7:662–663
131. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009; 458:1131–1135
132. Kudchodkar SB, Levine B. Viruses and autophagy. *Rev Med Virol*. 2009; 19:359–378
133. Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin XM. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*. 2007
134. Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell*. 2011; 44:279–289
135. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*. 1966; 28:435–492
136. Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci*. 1999; 14:180–198
137. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*. 2005; 8:3–5.
138. Rodriguez-Enriquez S, Kim I, Currin RT, Lemasters JJ. Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy*. 2006; 2:39–46
139. Ding WX, Manley S, Ni HM. The emerging role of autophagy in alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011; 236:546–556
140. O. Corti, S. Lesage, and A. Brice, “What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson’s disease,” *Physiological Reviews*, vol. 91, no. 4, pp. 1161–1218, 2011

141. E. Deas, H. Plun-Favreau, S. Gandhi et al., "PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL," *Human Molecular Genetics*, vol. 20, no. 5, pp. 867–879, 2011.
142. A.W. Greene, K. Grenier, M. A. Aguilera et al., "Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment," *EMBO Reports*, vol. 13, no. 4, pp. 378–385, 2012.
143. J. C. Rochet, B. A. Hay, and M. Guo, "Molecular insights into Parkinson's disease," *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 107, pp. 125–188, 2012.
144. K. R. Kumar, A. Djarmati-Westenberger, and A. Grunewald, "Genetics of Parkinson's disease," *Seminars in Neurology*, vol. 31, no. 5, pp. 433–440, 2011.
145. J. M. Taymans, C. Van Den Haute, and V. Baekelandt, "Distribution of PINK1 and LRRK2 in rat and mouse brain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 98, no. 3, pp. 951–961, 2006
146. J. G. Blackinton, A. Anvret, A. Beilina, L. Olson, M. R. Cookson, and D. Galter, "Expression of PINK1 mRNA in human and rodent brain and in Parkinson's disease," *Brain Research*, vol. 1184, no. 1, pp. 10–16, 2007.
147. L. Silvestri, V. Caputo, E. Bellacchio et al., "Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism," *Human Molecular Genetics*, vol. 14, no. 22, pp. 3477–3492, 2005
148. A. Weihofen, K. J. Thomas, B. L. Ostaszewski, M. R. Cookson, and D. J. Selkoe, "Pink1 forms a multiprotein complex with miro and milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking," *Biochemistry*, vol. 48, no. 9, pp. 2045–2052, 2009
149. Pilsl and K. F. Winklhofer, "Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease," *Acta Neuropathologica*, vol. 123, no. 2, pp. 173–188, 2012.
150. Yamamoto, M. L. Cremona, and J. E. Rothman, "Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway," *Journal of Cell Biology*, vol. 172, no. 5, pp. 719–731, 2006.
151. S. Michiorri, V. Gelmetti, E. Giarda et al., "The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy," *Cell Death and Differentiation*, vol. 17, no. 6, pp. 962–974, 2010
152. A. Gautier, T. Kitada, and J. Shen, "Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 32, pp. 11364–11369, 2008.
153. H. L. Wang, A. H. Chou, A. S. Wu et al., "PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1812, no. 6, pp. 674–684, 2011.
154. S. J. Cherra III and C. T. Chu, "Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: a question of balance," *Future Neurology*, vol. 3, no. 3, pp. 309–323, 2008.
155. R. K. Dagda, S. J. Cherra, S. M. Kulich, A. Tandon, D. Park, and C. T. Chu, "Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 20, pp. 13843–13855, 2009.

156. G. Shi, J. R. Lee, D. A. Grimes et al., "Functional alteration of PARL contributes to mitochondrial dysregulation in Parkinson's disease," *Human Molecular Genetics*, vol. 20, no. 10, pp. 1966–1974, 2011.
157. T. Chu, "A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease," *Human Molecular Genetics*, vol. 19, no. 1, pp. R28–R37, 2010
158. Y. Kim, J. Park, S. Kim et al., "PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 377, no. 3, pp. 975–980, 2008.
159. Narendra, A. Tanaka, D. F. Suen, and R. J. Youle, "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy," *Journal of Cell Biology*, vol. 183, no. 5, pp. 795–803, 2008
160. Kathrin Lutz, N. Exner, M. E. Fett et al., "Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 34, pp. 22938–22951, 2009
161. M. E. Gegg and A. H. V. Schapira, "PINK1-parkin-dependent mitophagy involves ubiquitination of mitofusins 1 and 2: implications for Parkinson disease pathogenesis," *Autophagy*, vol. 7, no. 2, pp. 243–245, 2011
162. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 2010; 189: 211–212
163. Geisler S, Holmstroem KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ et al. PINK1/ Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 119–U70
164. Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen D, Karbowski M et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 2010; 191: 1367–1380
165. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 9–14.
166. Van Humbeeck C, Cornelissen T, Vandenberghe W, Ambra1 A. Parkin-binding protein involved in mitophagy. *Autophagy* 2011; 7: 1555–1556
167. Shin J, Ko HS, Kang H, Lee Y, Lee Y, Pletinkova O et al. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 alpha contributes to neurodegeneration in Parkinsonss disease. *Cell* 2011; 144: 689–702
168. Karbowski M and Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 870–880, 2003.
169. Rambold AS, Kosteleccky B, Elia N, and Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10190–10195, 2011.
170. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, and Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183: 795–803, 2008.

171. Kim Y, Park J, Kim S, Song S, Kwon SK, Lee SH, Kitada T, Kim JM, and Chung J. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 975–980, 2008
172. Shiba K, Arai T, Sato S, Kubo S, Ohba Y, Mizuno Y, and Hattori N. Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 331–335, 2009
173. Sha D, Chin LS, and Li L. Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB signaling. *Hum Mol Genet* 19: 352–363, 2010.
174. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, and Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27: 433–446, 2008
175. Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, and Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 19: 4861–4870, 2010
176. Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, and Springer W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12: 119–131, 2010
177. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, and Johansen T p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131–24145, 2007
178. Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, and Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 6: 1090–1106, 2010
179. Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, and Yao TP. Diseasecausing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* 189: 671–679, 2010
180. Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, and Wang J. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454: 232– 235, 2008.
181. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, and Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 34: 259–269, 2009.

*Ringrazio vivamente il mio tutor, la dottoressa Lodovica Vergani,
e tutto il laboratorio neuromuscolare, dove ho svolto il mio internato di tesi,
per avermi accompagnato con passione nel mondo della ricerca.
Un grazie particolare va al mio compagno, Carlo,
per avermi sempre sostenuto, capito e aiutato durante questi tre anni di dottorato.*