





# ***UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA***

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali



*Scuola di Dottorato di Ricerca in Bioscienze: Indirizzo Biologia  
Cellulare*

*Ciclo XX*

## **Identificazione e caratterizzazione di nuovi inibitori del poro della transizione della permeabilità mitocondriale.**

COORDINATORE: Ch.mo Prof. TULLIO POZZAN  
Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

SUPERVISORE: Ch.mo Prof. PAOLO BERNARDI  
Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

DOTTORANDO: ALBERTO GAMBALUNGA

31 Gennaio 2008



# INDICE

<b>Abbreviazioni</b> .....	<b>7</b>
<b>1.SOMMARIO</b> .....	<b>9</b>
<b>1.SUMMARY</b> .....	<b>10</b>
<b>2.INTRODUZIONE</b> .....	<b>11</b>
2.1 TRANSIZIONE DI PERMEABILITÀ MITOCONDRIALE .....	11
2.2 REGOLAZIONE DEL PORO DI TRANSIZIONE DI PERMEABILITÀ .....	13
2.2.1 Effettori di membrana .....	14
2.2.2 Effettori di matrice.....	14
2.3 CONSEGUENZE DELL'APERTURA DEL PTP .....	15
2.4 STRUTTURA DEL PTP .....	20
2.4.1 Ruolo del PBR.....	21
2.4.2 Ruolo dell' ANT .....	22
2.4.3 Ruolo di VDAC .....	22
2.4.4 Ruolo della CyP-D.....	24
2.4.5 Altri modelli proposti .....	25
2.5 LA TRANSIZIONE DI PERMEABILITÀ IN FISIOPATOLOGIA .....	27
2.5.1 Ischemia-riperfusion del miocardio .....	27
2.5.2 Malattie epatiche .....	28
2.5.3 Malattie neuronali .....	29
2.5.4 Malattie muscolari.....	30
2.6 IDENTIFICAZIONE DI NUOVI INIBITORI DEL PTP .....	31
2.6.1 Screening primario .....	32
2.6.2 Screening secondario.....	35
<b>3.SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>39</b>
<b>4. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>41</b>
4.1 STUDI IN MITOCONDRI ISOLATI.....	41
4.1.1 Preparazione di mitocondri da fegato di topo.....	41
4.1.2 Preparazione di mitocondri da cellule HeLa.....	41
4.1.3 Misurazione della concentrazione di $Ca^{2+}$ extramitocondriale .....	42
4.1.4 Misurazione della capacità dei mitocondri di ritenere $Ca^{2+}$ .....	42
4.1.5 Misurazione della concentrazione di ossigeno.....	43
4.1.6 Misurazione della variazione di volume mitocondriale .....	44
4.1.7 Misurazione della resistenza al lavaggio dei composti.....	44
4.2 STUDI IN CELLULE IN COLTURA. ....	44
4.2.1 Colture cellulari.....	44
4.2.2 Microscopio ad epifluorescenza.....	45
4.2.3 Studio delle variazioni del $\Delta\Psi_m$ in cellule .....	46
4.2.4 Analisi delle immagini ottenute con la TMRM .....	47
4.2.5 Misurazione della CRC di cellule HeLa permeabilizzate .....	47
4.2.6 Determinazione della morte cellulare.....	48
<b>5.RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>51</b>
5.1 CARATTERIZZAZIONE DEGLI EFFETTI MITOCONDRIALI DEGLI INIBITORI.....	51
5.1.1 Caratterizzazione degli effetti mitocondriali di CngPtP003.....	51
5.1.2 Caratterizzazione degli effetti mitocondriali di CngPtP006.....	54

5.2	RELAZIONE CON GLI EFFETTI INIBITORI DELLA CSA .....	55
5.2.1	<i>CngPtP003 e CsA</i> .....	55
5.2.2	<i>CngPtP006 e CsA</i> .....	57
5.3	DETERMINAZIONE DELLA RESISTENZA AL LAVAGGIO .....	58
5.4	STUDIO DELL'EFFETTO DEGLI INIBITORI IN CELLULE INTATTE .....	60
5.4.1	<i>Attività sul potenziale di membrana mitocondriale</i> .....	60
5.4.2	<i>Protezione dalla depolarizzazione indotta da Acido Arachidonico</i> .....	63
5.5	STUDIO DELL'EFFETTO DEGLI INIBITORI IN CELLULE HELA PERMEABILIZZATE	66
5.6	STUDIO DELL'EFFETTO DEGLI INIBITORI IN MITOCONDRI ISOLATI DA CELLULE HELA.....	69
5.7	STUDIO DELL'EFFETTO DI CNGPTP003 SULLA MORTE CELLULARE .....	71
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>73</b>
	<b>Referenze.....</b>	<b>75</b>

# Abbreviazioni

AAF, 2-acetilaminofluorene  
ANT, traslocatore degli Adenin nucleotidi;  
CRC, capacità dei mitocondri di ritenere calcio  
CsA, ciclosporina A;  
CsH, ciclosporina H;  
CyP- D, ciclofilina D;  
DMSO, dimetilsolfossido;  
DNF, 2-dinitrofenolo  
EDTA, acido etilen-diamino-tetraacetico;  
EGTA, acido etilen-bis (oxoetilenenitrilo) tetracetico;  
FCCP, carbonilcianuro-p-trifluorometossifenilidrazone  
FBS, siero fetale bovino;  
HBSS, soluzione salina di Hanks;  
MDR, proteina responsabile della resistenza alla polichemioterapia;  
MLM, mitocondri isolati da fegato di topo  
MMC, megacanal mitocondriale  
PBR, recettore periferico per le benzodiazepine  
PI, propidio ioduro;  
PS, fosfatidilserina;  
PTP, poro di transizione della permeabilità mitocondriale;  
Rho123, rodamina 123  
ROIs, regioni di interesse (ricche di mitocondri);  
SD, deviazione standard;  
TMRM, tetrametilrodamina metil estere;  
VDAC, canale anionico voltaggio dipendente  
 $\Delta\Psi_m$ , differenza di potenziale elettrico della membrana mitocondriale interna;





# 1.SOMMARIO

Nel corso di questa tesi abbiamo studiato le proprietà di due molecole emerse nel corso di uno screening di una libreria di composti chimici effettuata con lo scopo di individuare nuovi inibitori del poro della transizione della permeabilità (PTP) mitocondriale. Da questo screening, eseguito presso i laboratori della Genextra S.p.A. di Milano e basato su un saggio di rigonfiamento mitocondriale indotto da  $Ca^{2+}$ , sono emersi vari composti capaci di inibire il PTP. Due di questi, denominati CngPTP003 e CngPtP006, sono stati caratterizzati dal punto di vista biologico nel corso di questa tesi di Dottorato.

Gli studi hanno confermato le proprietà inibitorie sul PTP in mitocondri isolati da fegato di topo ed è stato dimostrato che il sito d'azione è diverso da quello della Ciclosporina A, noto inibitore del PTP.

Ne sono state poi studiate le proprietà in cellule HeLa in coltura. Da questi esperimenti è emerso che solo il CngPtP003 è in grado di proteggere le cellule dalla depolarizzazione conseguente all'apertura del poro indotta da Acido Arachidonico. Questi dati sono stati confermati sia in mitocondri isolati da cellule HeLa sia in varie linee cellulari umane previa permeabilizzazione, indicando quindi chiaramente che l'azione inibitoria sul PTP del composto CngPtP006 è specie-specifica.

Infine è stato dimostrato che il CngPtP003 è in grado anche di proteggere le cellule HeLa dalla morte indotta sempre da Acido Arachidonico.

# 1.SUMMARY

We have characterized the mitochondrial and cellular effects of two molecules identified by Genextra's S.p.A from a chemical library by high throughput screening (HTS) designed to identify novel inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore (PTP). The screening, based on in vitro calcium-induced mitochondrial swelling, yielded several PTP inhibitory compounds and two of them, CngPtP003 and CngPtP006, have been selected for the present study. We studied the inhibitory properties of CngPtP003 and CngPtP006 on PTP in isolated mouse liver mitochondria with the Calcium Retention Capacity (CRC) assay, and the inhibitory profiles compared with those displayed by the well known PTP inhibitor cyclosporin A (CsA). From this first set of experiments we confirmed that both compounds are PTP inhibitors with different biological potency and efficacy, and that their molecular targets are not the same as that of CsA, with which both compounds displayed additive effects. In a second set of experiments we studied the mitochondrial effects of CngPtP003 and CngPtP006 in intact HeLa cells with the tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) assay, which measures the mitochondrial membrane potential. We found that only CngPtP003 is able to protect the cells from the depolarization and from cell death caused by the PTP inducer arachidonic acid. Lack of inhibition by CngPtP006 data has been confirmed both in HeLa isolated mitochondria and in several human permeabilized cell lines, indicating that the inhibitory properties of CngPtP006 are limited to mouse mitochondria, which were used in the primary screening. These results validate the HTS approach for the identification of novel PTP inhibitors, whose suitability for drug development is currently under investigation.

## 2.INTRODUZIONE

### **2.1 Transizione di permeabilità mitocondriale**

La transizione di permeabilità mitocondriale è un fenomeno dovuto all'apertura di un canale ad alta conduttanza della membrana mitocondriale interna, il poro della transizione della permeabilità (PTP), che comporta un aumento della permeabilità a ioni e soluti di peso molecolare fino a circa 1500 Da. Nelle condizioni sperimentali della maggior parte degli studi *in vitro* la transizione di permeabilità è accompagnata da depolarizzazione, rigonfiamento della matrice, deplezione dei piridin nucleotidi, rottura della membrana esterna e rilascio di proteine intermembrana come ad esempio il citocromo *c* (Liu *et al.*, 1996; Bernardi 1999; Crompton 1999). Come vedremo fra breve il PTP è modulato da molti fattori di rilevanza fisiopatologica, ma l'accumulo di  $Ca^{2+}$  nella matrice è uno dei fattori più importanti nel favorirne l'apertura.

L'apertura del PTP dissipa il gradiente protonico e di conseguenza impedisce la sintesi di ATP, mentre la respirazione tende, inizialmente, ad aumentare per effetto della depolarizzazione. L'entrata in matrice di soluti, con conseguente richiamo di acqua, provoca il rigonfiamento osmotico del mitocondrio, cui seguono distensione delle creste, rottura della membrana esterna e rilascio di proteine. Infine la transizione di permeabilità comporta la diffusione di substrati e fattori della respirazione nel citosol, causando alla fine l'inibizione della respirazione (Vinogradov *et al.*, 1972).

La transizione di permeabilità è stata a lungo considerata una forma non specifica di danno di membrana a causa della sua mancanza di selettività. Tale opinione è cambiata in seguito ad una serie di recenti scoperte. Nel corso degli anni sono state proposte due teorie principali per spiegare la transizione di permeabilità mitocondriale:

- l'apertura di un poro proteico non selettivo (Haworth e Hunter, 1979; Hunter e Haworth, 1979a, b) con un diametro minimo di 3 nm (Massari e Azzone, 1972).

- un'alterazione della fase lipidica della membrana interna causata dall'attivazione  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente della fosfolipasi  $\text{A}_2$  ed al conseguente accumulo di lisofosfolipidi (Pfeiffer *et al.*, 1979).

Grazie a studi elettrofisiologici di patch-clamp (Sorgato *et al.*, 1987), l'esistenza di un canale nella membrana mitocondriale interna fu confermata alla fine degli anni 80 (Kinnally *et al.*, 1989; Petronilli *et al.*, 1989). Questi due studi dimostrano come nella membrana mitocondriale interna sia presente un canale ad alta conduttanza ( $\sim 1\text{nS}$ ) chiamato megacanal mitocondriale (MMC), che possiede tutte le componenti regolatrici di base del PTP, lasciando pochi dubbi sul fatto che si tratti della stessa entità molecolare (Bernardi *et al.*, 1992, Szabò *et al.*, 1992; Szabò e Zoratti, 1992).

Un'altra prova sperimentale a favore dell'esistenza del poro è stata la dimostrazione che il farmaco immunosoppressore ciclosporina A (CsA), a concentrazione nanomolare, è in grado di inibire la transizione di permeabilità (Szabò e Zoratti, 1991; Crompton *et al.*, 1987; Broekemeier *et al.*, 1989). Successivamente è stato dimostrato che la CsA si lega ad una ciclofilina mitocondriale, Ciclofilina D (Cyp-D), una peptidil-prolil *cis-trans* isomerasi la cui attività enzimatica è bloccata dalla CsA nello stesso range di concentrazioni necessarie per l'inibizione del poro (Connern e Halestrap, 1992; Nicolli *et al.*, 1996). Come vedremo in seguito, la recente caratterizzazione di mitocondri da topi in cui è stato inattivato il gene *Ppif*, che codifica per la CyP-D, ha permesso una migliore comprensione del ruolo della CyP-D nella regolazione del PTP (Baines *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2005). In particolare, da tali studi emerge come la CyP-D sia un regolatore, piuttosto che un componente, del PTP. L'implicazione che ne deriva è che l'effetto della CsA è meglio descritto come una "desensibilizzazione" che non una vera e propria inibizione del PTP, in quanto il suo effetto, come pure quello della mancanza di CyP-D, può essere superato da un incremento di calcio mitocondriale.

Infine, un terzo contributo è stata la dimostrazione che il PTP è controllato dal gradiente elettrochimico protonico ( $\Delta p$ ). Infatti la transizione aperto-chiuso è modulata sia dal potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ), che dal pH di matrice (Bernardi, 1992; Nicolli *et al.*, 1993; Petronilli *et*

*al.*, 1993). Questo implica che la soglia di voltaggio per l'apertura-chiusura del PTP sarà influenzata da una varietà molto ampia di effettori fisiopatologici (Petronilli *et al.*, 1993; Petronilli *et al.*, 1994).

## 2.2 Regolazione del poro di transizione di permeabilità

Da come si può vedere in Fig. 1, l'attività del PTP è regolata da molteplici fattori che possono facilitarne l'apertura (induttori) o la chiusura (inibitori) e che si possono distinguere in effettori di membrana e in effettori di matrice (Bernardi *et al.*, 2006 per una review dettagliata).

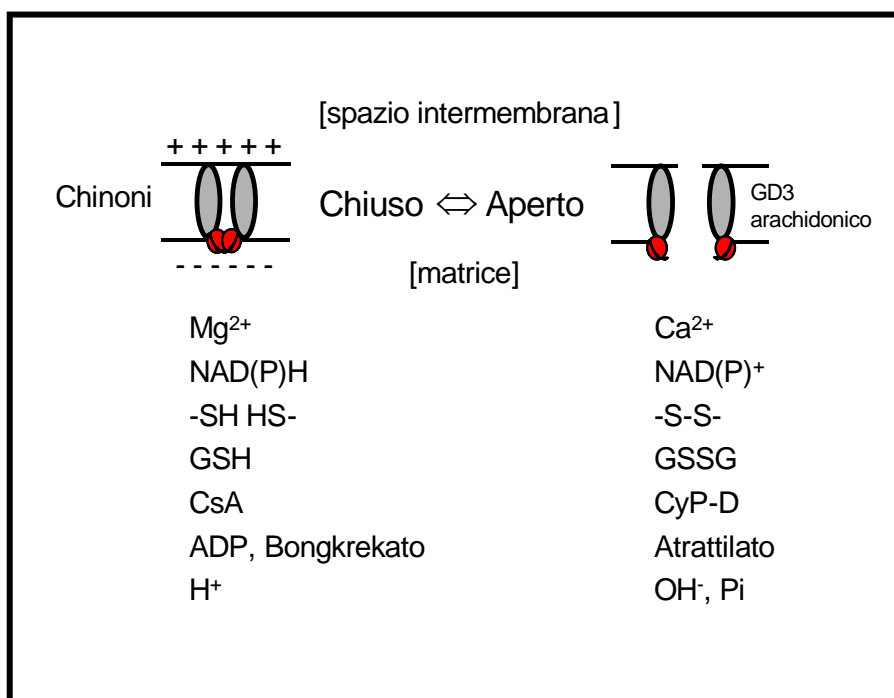


Fig.1. **Rappresentazione schematica degli attivatori e degli inibitori del PTP.** Lo schema di sinistra rappresenta la configurazione chiusa del poro ed elenca i fattori che tendono a stabilizzarlo in questa condizione; i simboli + e - mostrano la presenza del potenziale trans membrana ma anche la voltaggio dipendenza del PTP, che favorisce la conformazione chiusa all'aumentare della differenza di potenziale. Lo schema di destra rappresenta la configurazione aperta del poro ed elenca i fattori che tendono a stabilizzarlo in questa condizione. (Modificata da Bernardi, 1999)

### **2.2.1 Effettori di membrana**

Il PTP si comporta come un canale modulato dal voltaggio. A valori di potenziale di membrana più negativi (cioè fisiologici) è favorita la conformazione chiusa (Bernardi, 1992), mentre la depolarizzazione ne favorisce la conformazione aperta. I modulatori del PTP alterano il valore di potenziale soglia a cui si verifica l'apertura del PTP (Petronilli *et al.*, 1993a). Ad esempio, il  $\text{Ca}^{2+}$  favorisce l'apertura del PTP spostando il potenziale soglia verso valori più negativi, mentre il  $\text{Mg}^{2+}$  e l'ADP ne favoriscono la chiusura portandolo a livelli meno negativi. Si ipotizza quindi, l'esistenza di un sensore di membrana che determinerebbe il potenziale soglia a cui si verifica l'apertura (Petronilli *et al.*, 1993b; Scorrano *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 1998).

In generale, anioni anfipatici, come ad esempio acidi grassi prodotti dalla fosfolipasi  $A_2$ , favoriscono la transizione di permeabilità con un effetto che non dipende dalla loro azione come depolarizzanti. In particolare l'acido arachidonico sembrerebbe avere un ruolo chiave nel signalling apoptotico  $\text{Ca}^{2+}$ - dipendente attraverso il PTP (Scorrano *et al.*, 2001; Penzo *et al.*, 2004).

Al contrario, i policationi, i cationi anfipatici come le sfingosine e peptidi carichi positivamente inibiscono l'apertura del poro (Bernardi *et al.*, 1994). L'ipotetico sensore del voltaggio potrebbe comprendere alcuni particolari residui di arginina in quanto, reagenti selettivi per l'arginina vanno a modulare il voltaggio del PTP (Linder *et al.*, 2002; Johans *et al.*, 2005). Il PTP è inoltre regolato dal flusso elettronico attraverso il complesso I della catena respiratoria, con un incremento della probabilità di apertura all'aumentare del flusso (Fontaine *et al.*, 1998). Anche i chinoni regolano la transizione di permeabilità, probabilmente attraverso un sito specifico di binding (Walter *et al.*, 2002).

### **2.2.2 Effettori di matrice**

L'apertura del poro è favorita dal  $\text{Ca}^{2+}$  di matrice attraverso un sito che può essere competitivamente inibito da altri ioni  $\text{Me}^{2+}$ , come ad esempio

Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, e dal fosfato attraverso un meccanismo ancora poco chiaro. L'apertura è promossa sia dallo stato ossidato dei piridin nucleotidi che di ditioli specifici, ed entrambi gli effetti possono essere annullati da opportuni riducenti (Petronilli *et al.* 1994; Costantini *et al.*, 1996, 1998). Inoltre la conversione ditiolo-disolfuro è correlata allo stato redox del glutatione e può essere bloccata dal 1-cloro-2,4-dinitrobenzene, suggerendo quindi che i ditioli in questione siano in equilibrio redox con il glutatione di matrice (Chernyak e Bernardi, 1996). Questi eventi spiegano l'effetto induttore di p66Shc, il quale va ad ossidare direttamente il citocromo *c* producendo anione superossido, che causa morte cellulare PTP-dipendente (Trinei *et al.*, 2002; Giorgio *et al.*, 2005).

La transizione di permeabilità è poi strettamente regolata dal pH di matrice. In mitocondri de-energizzati infatti, l'optimum di pH per l'apertura è 7.4. A valori più bassi, la probabilità di apertura diminuisce a seguito della protonazione reversibile di residui di istidina (Bernardi, 1992; Nicolli *et al.*, 1993), mentre a valori più alti diminuisce attraverso un meccanismo non ancora noto. Recenti risultati del nostro laboratorio hanno evidenziato come la modulazione del PTP da parte del pH di matrice, per valori compresi tra 6.0 e 7.0, sia identica nei mitocondri *Ppif*<sup>-/-</sup> e wild-type. Questo dimostra che le istidine che modulano il PTP non sono localizzate a livello della CyP-D (Basso *et al.*, 2005).

Il PTP è modulato anche dai ligandi del traslocatore degli adenin nucleotidi (ANT). L'atrattilato, che inibisce l' ANT e lo stabilizza nella conformazione *c* ne favorisce l'apertura, mentre l'ADP e il bongkrekato, che inibisce anch'esso l'ANT ma lo stabilizza nella conformazione *m*, ne favoriscono la chiusura (Schultheiss *et al.*, 1984).

### **2.3 Conseguenze dell'apertura del PTP**

L'apertura del PTP causa depolarizzazione della membrana mitocondriale interna e questo è seguito da perdita dell'omeostasi ionica, visto che gli ioni diffondono attraverso questa via fino al raggiungimento dell'equilibrio chimico. Dato che il coefficiente di esclusione molecolare del

PTP è di circa 1500 Da, i soluti con peso molecolare inferiore possono essere rilasciati secondo gradiente di concentrazione.

In conseguenza ad una prolungata apertura del PTP si ha quindi deplezione di substrati e piridin nucleotidi (Vinogradov *et al.*, 1972) con conseguente inibizione della respirazione. Questo causa una catastrofe energetica in quanto in questa condizione i mitocondri cessano di produrre ATP e iniziano invece ad idrolizzarlo contribuendo così alla sua deplezione (Di Lisa F. e Bernardi, 1998). Inoltre l'apertura del PTP causa una disregolazione dell'omeostasi del  $Ca^{2+}$  come conseguenza diretta della disfunzione mitocondriale e come conseguenza indiretta della deplezione di ATP. L'aumento massiccio di  $Ca^{2+}$  citosolico può attivare meccanismi endogeni di morte cellulare e l'apertura del PTP indotta dall'accumulo di  $Ca^{2+}$  in matrice potrebbe essere fra questi.

### **2.3.1 Morte cellulare e ruolo dei mitocondri**

Le cellule possono andare incontro a morte attraverso due principali meccanismi: la necrosi, o morte cellulare accidentale, e l'apoptosi, o morte cellulare programmata.

La necrosi è una risposta di morte a stimoli particolarmente intensi di tipo fisico e chimico, ed è caratterizzata dalla formazione di vacuoli citoplasmatici, dal rigonfiamento che coinvolge sia la cellula che gli organelli, con conseguente rottura della membrana plasmatica che porta alla fuoriuscita del contenuto intracellulare, e da cambiamenti morfologici del nucleo. Questi eventi si associano, di solito, ad una risposta infiammatoria da parte dell'organismo con un possibile ulteriore danno tissutale secondario. Quando invece, la cellula va incontro ad apoptosi si verifica una rapida diminuzione del volume cellulare, si osserva la condensazione della cromatina fino alla picnosi, seguita dalla frammentazione del DNA da parte delle endonucleasi, e alla formazione di evaginazioni sulla membrane plasmatica che staccandosi danno luogo ai cosiddetti "corpi apoptotici". Questi vengono riconosciuti e rimossi dalle cellule fagocitarie senza coinvolgimento quindi di meccanismi infiammatori. La morte cellulare programmata necessita



di energia sotto forma di ATP e le caratteristiche morfologiche che l'accompagnano sono il risultato dell'attivazione di specifiche proteasi chiamate caspasi, che tagliano diverse proteine a livello dei residui di acido aspartico, da cui il nome *cysteine aspartic specific protease* (Alnemri *et al.*, 1996). Le caspasi sono normalmente presenti in forma inattiva (procaspasi) nella cellula, e vengono attivate in vari modi a seguito di stimoli specifici. Da come si può vedere in Fig. 2, l'induzione dell'apoptosi avviene attraverso due vie distinte: la *via estrinseca*, che viene innescata da specifiche interazioni ligando-recettore. I ligandi sono peptidi solubili (es TNF- $\alpha$ , FasL) che, legandosi selettivamente ai recettori di morte della famiglia dei *Tumor Necrosis Factor receptors* (es TNFR-1 per il TNF- $\alpha$  e Fas per FasL), ne inducono l'attivazione (Nagata, 1997); la *via intrinseca*, che viene innescata sia da un ampio spettro di stress intracellulari, come ad esempio radiazioni, agenti chimici, stress ossidativi e danni al DNA, ma può anche venire innescata dalla stessa via estrinseca attraverso il taglio proteolitico della caspasi-8 su BID, una proteina della famiglia di Bcl-2 a localizzazione citosolica, con formazione della forma troncata t-BID che migra sui mitocondri dove promuove il rilascio del citocromo c. Quest'ultimo, insieme all' *Apoptosis protease-activating factor* (Apaf-1), alla procaspasi-9 e in presenza di ATP, forma un complesso molecolare detto apoptosoma che attiva le caspasi effettrici inducendo così morte cellulare (Krammer, 2000; Liu *et al.*, 1996).

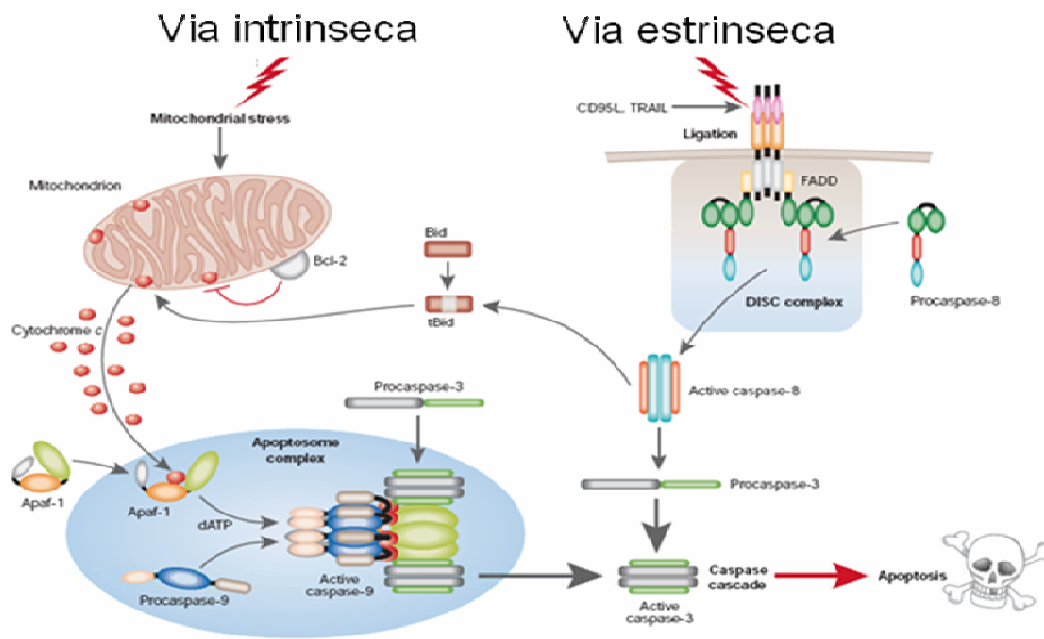


Fig. 2. **Rappresentazione schematica della via estrinseca ed intrinseca dell'apoptosi.** Figura modificata da MacFarlane e Williams 2004.

Il citocromo *c* è quindi una delle proteine proapoptotiche più importanti ed è presente nei mitocondri in due localizzazioni: circa il 15% si trova nello spazio intermembrana, mentre il restante 85% si trova probabilmente a livello di compartimenti delimitati da cristae adiacenti (Bernardi e Azzone, 1981). Alcuni modelli propongono che questa proteina venga rilasciata dai mitocondri in seguito alla transizione di permeabilità e alla rottura della membrana esterna (Bernardi *et al.*, 2001; Desagher e Martinou, 2000); è possibile però che la liberazione del citocromo *c* avvenga attraverso il rimodellamento delle cristae che aumenterebbe la comunicazione fra i due "pool", incrementandone il rilascio attraverso canali formati dalle proteine proapoptotiche BAX/BAK (vedi Fig. 3) che fanno parte della famiglia di proteine BCL-2 (Scorrano *et al.*, 2002).

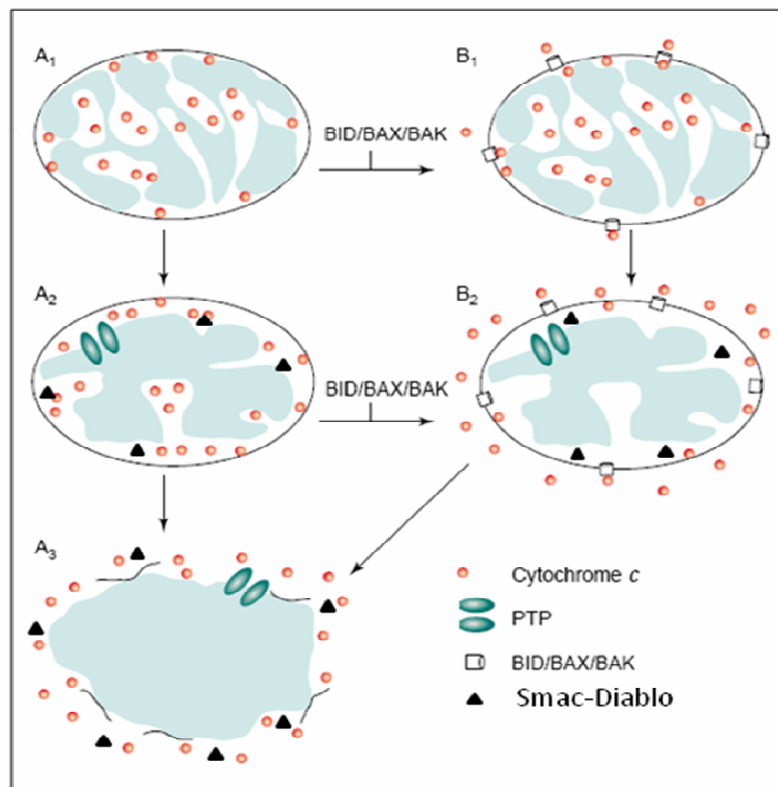


Fig. 3. **Meccanismi di rilascio di proteine proapoptotiche mitocondriali.** Sulla base di studi funzionali e strutturali è stato ipotizzato che il citocromo c si trovi compartimentalizzato a livello mitocondriale (A1) e che l'interazione delle proteine della famiglia BCL-2 (BID, BAX e BAK) sia coinvolta nel rilascio solo di una limitata quantità di citocromo c, cioè il 15% che si trova nello spazio intermembrana (B1). Grazie all'apertura del PTP i mitocondri si rigonfiano permettendo al citocromo c presente tra le cristae di ridistribuirsi nello spazio intermembrana (A2), in questo caso i canali proteici formati da BID, BAX e BAK causano il rilascio di un quantità decisamente maggiore di citocromo c (B2). Per quanto riguarda il rilascio di altre proteine mitocondriali (come Smac-Diablo) è necessario che il rigonfiamento sia tale da produrre la rottura della membrane esterna (A3). (Modificata da Bernardi, 2001)

Il PTP, oltre a quello del citocromo c, è anche coinvolto nel rilascio di altri fattori proapoptotici (Kroemer e Reed, 2000) quali la proteina Smac/Diablo (Du *et al.*, 2000; Ekert *et al.*, 2000) che favorisce l'attivazione delle caspasi neutralizzando gli inibitori delle proteine apoptotiche, AIF (*Apoptosis inducing factor* Susin *et al.*, 1999) ed endonucleasi G.

Anche se è senz'altro utile distinguere tra necrosi ed apoptosi, appare sempre più chiaro che i due tipi di morte rappresentano spesso gli estremi di un unico processo. Si è osservato infatti che l'aumento dell'intensità dello stimolo (tempo di esposizione e concentrazione), può determinare un cambiamento del tipo di morte da apoptosi a necrosi (Leist e Nicotera, 1997).

E' stato anche dimostrato sperimentalmente che la riduzione dei livelli intracellulari di ATP in cellule sottoposte a stimoli tipicamente proapoptotici porta ad una modificazione del "programma" con transizione alla morte per necrosi (Ankarcrona *et al.*, 1995). Questi risultati fanno pensare che uno stesso stimolo possa attivare dei segnali iniziali condivisi da entrambi i tipi di morte e in seguito la situazione energetica, che dipende in gran parte dalla funzione mitocondriale, possa determinare il destino cellulare. Va anche osservato che la morte cellulare, programmata o meno, vede inoltre il coinvolgimento di altre cascate enzimatiche come quelle che coinvolgono le fosfolipasi e le calpaine (Vandenabeele *et al.*, 2005).

## **2.4 Struttura del PTP**

A dispetto del crescente interesse verso i mitocondri ed in particolare verso il PTP, la struttura di quest'ultimo rimane in gran parte elusiva. Come si può vedere in Fig. 4, nel recente passato era stata proposta una sua ipotetica architettura molecolare, nella quale si ipotizzava che il PTP fosse un complesso di diverse proteine transmembrana: l' ANT, il canale anionico voltaggio-dipendente (VDAC) e il recettore periferico per le benzodiazepine (PBR). A tale complesso si associavano membri della famiglia Bcl-2, esochinasi II, creatin chinasi mitocondriale e la CyP-D.

Andremo ora ad esaminare perché è stata posta particolare attenzione su alcune proteine come ipotetici candidati alla costituzione del PTP e perché alcuni risultati sperimentali devono essere valutati con cautela.

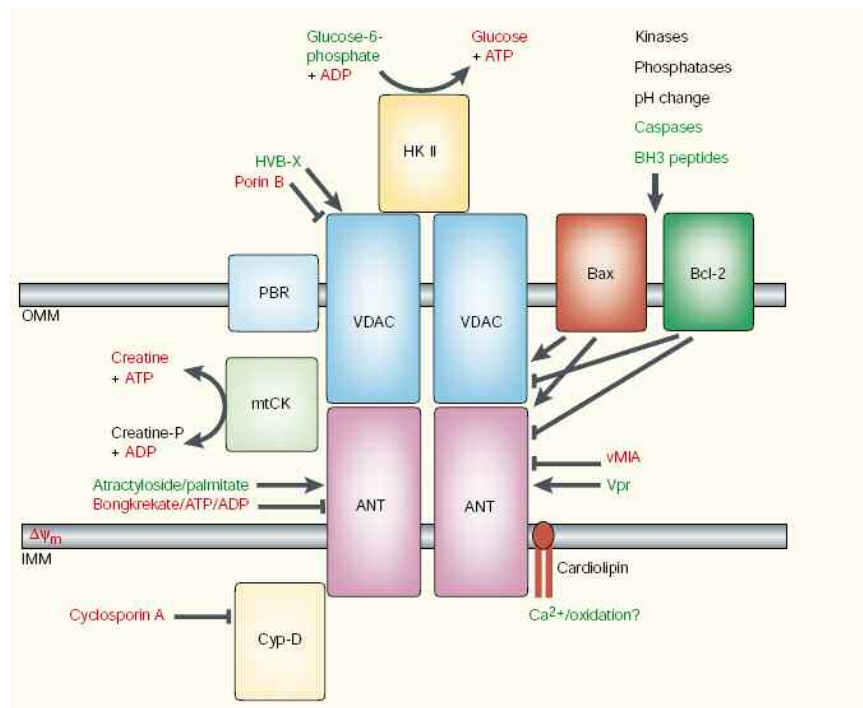


Fig. 4. **Ipotetica struttura molecolare del complesso del PTP.** Da Zamzami e Kroemer, 2001.

### 2.4.1 Ruolo del PBR

Il PBR è una proteina altamente idrofobica di 18 kDa localizzata nella membrana mitocondriale esterna (Anholt *et al.*, 1986), ed è stata identificata come il sito di legame per le benzodiazepine nei tessuti che non hanno i recettori per il 4-aminobutirrato, che sono i loro bersagli nel sistema nervoso centrale. Il PBR non ha omologia di sequenza aminoacidica con i recettori del 4-aminobutirrato, e può essere distinto farmacologicamente da questi per la capacità che possiede di legarsi ad alta affinità (nM) a molecole PBR-specifiche (Hirsch *et al.*, 1998; Le Fur *et al.*, 1983).

La purificazione biochimica del PBR ha mostrato una sua stretta associazione con ANT e VDAC (McEnery *et al.*, 1992) e ciò ha fatto ipotizzare che questo recettore facesse parte del PTP. In realtà, esperimenti eseguiti per verificare l'attività dei ligandi di PBR sul PTP hanno mostrato effetti contraddittori (inibizione per alcuni e induzione per altri), e non riproducibili (dipendenti dal tipo di cellula in esame e dalla concentrazione di

utilizzo), indebolendo ulteriormente questa ipotesi (Berson *et al.*, 2001; Bono *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 2002).

Sarebbe quindi di grande aiuto l'analisi di mitocondri preparati da animali nei quali l'espressione di PBR sia stata eliminata geneticamente. Sfortunatamente però i tentativi in questo senso hanno dimostrato che l'eliminazione non condizionale di PBR causa mortalità embrionale (Papadopoulos *et al.*, 1997).

Quindi, benché non possa essere escluso che il PBR faccia parte del PTP, le conclusioni basate sull'uso esclusivo dei suoi ligandi dovrebbero essere interpretate con molta cautela.

### **2.4.2 Ruolo dell' ANT**

ANT è un traslocatore che permette il passaggio dell'ATP sintetizzato in matrice nel citosol, in scambio con l'ADP, ed è la proteina di membrana più abbondante nei mitocondri.

Abbiamo già visto come il PTP sia modulato dai ligandi di ANT. Questi dati, in un primo tempo avevano quindi portato ad ipotizzare che il PTP potesse essere direttamente formato dall' ANT (Halestrap e Brenner, 2003).

In realtà, successivi studi in mitocondri di fegato di topi mancanti di tutte le isoforme di ANT, hanno rivelato come la transizione di permeabilità  $Ca^{2+}$ -dipendente avvenga ugualmente e sia completamente inibibile dalla CsA, e come possa essere anche attivata da  $H_2O_2$  e diamide, segno che ANT non è né il partner obbligatorio di legame con la CyP-D né il sito d'azione degli ossidanti. Inoltre, epatociti preparati da fegati controllo e da fegati mancanti di ANT, mostrano identica risposta all'attivazione della via apoptotica mediata dai recettori di morte TNF- $\alpha$  e Fas (Kokoszka *et al.*, 2004).

### **2.4.3 Ruolo di VDAC**

L'ipotesi che una proteina della membrana esterna potesse essere coinvolta nella formazione del PTP venne formulata sulla base di esperimenti su mitoplasti, cioè mitocondri privi della membrana esterna. In questi studi non vi era transizione di permeabilità in risposta a specifici stimoli e questo ha suggerito che la membrana esterna potesse avere un ruolo importante

(Le Quôc e Le Quôc, 1985). Diversi dati suggeriscono che la proteina della membrana esterna coinvolta nel PTP possa essere VDAC e questa idea si basa su diversi studi: (a) VDAC purificato e incorporato in doppi strati di fosfolipidi forma canali con un diametro di 2.5-3 nm le cui proprietà elettrofisiologiche sono molto simili a quelle del PTP (Szabò *et al.*, 1993; Szabò e Zoratti, 1993); (b) le proprietà del canale formato da VDAC sono modulate dal NADH, dal  $\text{Ca}^{2+}$  e dal glutammato (Zizi *et al.*, 1994, Gincel *et al.*, 2004; Pastorino *et al.*, 2002), e dal legame dell'esochinasi II (Pastorino *et al.*, 2002, 2005; Majewski *et al.*, 2004), tutte condizioni queste che modulano anche l'attività del PTP (Fontaine *et al.*, 1998; Costantini *et al.*, 1996, Pastorino e Hoek, 2003); (c) la cromatografia di affinità con CyP-D di estratti di mitocondri ha portato alla purificazione di VDAC e ANT, e in presenza di CyP-D si è osservata una permeabilizzazione ai soluti dei liposomi inibita da CsA (Crompton *et al.*, 1998).

Bisogna sottolineare però, che molti dei dati che supportano l'idea che VDAC sia un costituente del PTP, sono basati su una generalizzazione logica piuttosto tenue, cioè sul fatto che le proprietà di VDAC nei doppi strati lipidici assomiglino a quelle del PTP osservato nei mitocondri, ragion per cui VDAC “deve” essere parte del PTP.

Ancora una volta però, i dati più convincenti del ruolo di VDAC sulla formazione del PTP provengono da studi genetici. I mammiferi possiedono tre distinti geni che codificano per altrettante isoforme di VDAC: VDAC1, VDAC2 e VDAC3. Sono stati quindi creati topi nei quali i geni codificanti per le singole isoforme di VDAC, sono stati eliminati. I topi mancanti di VDAC1 e VDAC3 sono vivi ma hanno difetti nella respirazione mitocondriale associati ad anomalie di ultrastruttura (Wu *et al.*, 1999; Anflous *et al.*, 2001; Sampson *et al.*, 2001). L'assenza di VDAC2 provoca invece letalità embrionale. Mitocondri di fegato di topi KO per VDAC1 hanno una transizione di permeabilità identica a quella di topi wild type (Krauskopf *et al.*, 2006). Recentemente, Baines e collaboratori hanno dimostrato che i mitocondri di cuore da topi VDAC1<sup>-/-</sup>, VDAC3<sup>-/-</sup> e VDAC1<sup>-/-</sup> - VDAC3<sup>-/-</sup> mostrano un'induzione del PTP da  $\text{Ca}^{2+}$  e da stress ossidativo uguale ai mitocondri wild-type. Analogamente, l'induzione del PTP da  $\text{Ca}^{2+}$  e stress ossidativo e la

morte cellulare sono inalterati, o addirittura aumentati, in fibroblasti  $VDAC1^{-/-}$ ,  $VDAC2^{-/-}$ ,  $VDAC3^{-/-}$ ,  $VDAC1^{-/-} - VDAC3^{-/-}$  e  $VDAC1^{-/-} - VDAC2^{-/-} - VDAC3^{-/-}$ . Inoltre, mitocondri e cellule wild type e knock-out mostrano lo stesso rilascio di citocromo c, clivaggio delle caspasi e morte cellulare in risposta a membri della famiglia di BCL-2 proapoptotici come BAX e BID, indicando quindi, come VDAC (inteso in tutte e tre le isoforme) non sia necessario né per la transizione di permeabilità mitocondriale né per la morte cellulare indotta da membri della famiglia di BCL-2 (Baines *et al.*, 2007).

#### **2.4.4 Ruolo della CyP-D**

Al fine di dare una risposta ai quesiti fondamentali sul ruolo CyP-D nella regolazione del PTP, e sulla funzione della transizione di permeabilità nei normali processi biologici, quattro gruppi, fra i quali il nostro, hanno recentemente riportato la generazione di topi nei quali è stato inattivato il gene *Ppif* che codifica per la CyP-D (Baines *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2005; Schinzel *et al.*, 2005). In tutti gli studi, i topi *Ppif*<sup>-/-</sup> sono nati nei rapporti mendeliani attesi e non presentano alcun fenotipo patologico. In tre di questi studi, l'ablazione della CyP-D provoca un raddoppiamento della capacità di ritenere  $Ca^{2+}$  (CRC, cioè la soglia di  $Ca^{2+}$  richiesta per l'apertura del PTP), che diventa identica a quella di mitocondri wild-type trattati con CsA, la quale non ha nessun effetto sui *Ppif*<sup>-/-</sup>. In altre parole, la transizione di permeabilità può avvenire anche nei mitocondri privi di CyP-D, anche se il processo richiede quantità più elevate di  $Ca^{2+}$  e diventa insensibile all'inibizione da CsA (Baines *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2005; Schinzel *et al.*, 2005).

I dati presentati dal nostro laboratorio dimostrano inoltre che il PTP dei topi mutanti mantiene le sue proprietà regolatorie di base, come ad esempio la modulazione da parte del  $\Delta\Psi$ , degli adenin nucleotidi, dello stress ossidativo e la sensibilità agli inibitori (ad eccezione della CsA) e induttori.

Si può pertanto concludere che la CyP-D è un regolatore ma non un componente del PTP, la cui attività rimane anche in assenza della CyP-D.



### **2.4.5 Altri modelli proposti**

Nel 2002 He e Lemasters hanno proposto un modello alternativo, secondo il quale il poro si formerebbe a seguito dell'aggregazione di proteine integrali di membrana denaturate e danneggiate da ossidanti o altri stress (He e Lemasters, 2002). Tale modello si basa su una precedente osservazione in cui la transizione di permeabilità non sarebbe la conseguenza dell'apertura di un poro preformato, ma piuttosto deriverebbe da un danno ossidativo alle proteine di membrana (Kowaltowski *et al.*, 2001). Nel modello di He e Lemasters, la conduttanza attraverso questi aggregati proteici sarebbe normalmente bloccata da proteine "chaperon", come ad esempio la CyP-D, e sarebbe modulata dal  $Ca^{2+}$  in una maniera sensibile alla CsA. In particolare, quando tali aggregati proteici eccedono le proteine "chaperon" disponibili a bloccare la conduttanza, si avrebbe l'apertura di pori non regolati che sarebbero così insensibili alla CsA. Pur interessante, tale modello non tiene conto della regolazione del PTP da parte del voltaggio e del pH di matrice, difficili da spiegare in un sistema formato da un set eterogeneo di proteine denaturate. Inoltre, nel 2003 è stato identificato un inibitore del poro ad alta affinità, il Ro 68-3400, che inibisce il PTP a concentrazioni submicromolari senza modificare l'attività della CyP-D (Cesura *et al.*, 2003). Tale composto, va a legarsi specificamente ad una proteina di 32 kDa, e non piuttosto ad un ampio set di proteine che sarebbe ragionevole trovare in base al modello proposto da He e Lemasters.

Indipendentemente dalla natura molecolare del poro, è diffusa la convinzione che esso si formi in siti di contatto tra la membrana mitocondriale interna e quella esterna, e che esso attraversi entrambe le membrane (Zamzami e Kroemer, 2001). Questa idea è basata più su assunzioni che su veri e propri dati sperimentali. Bisogna inoltre, tener conto che l'esistenza di punti di fusione tra la membrana interna e quella esterna è stata messa in dubbio dalla tomografia di mitocondri non fissati (Frey e Mannella, 2000). Va infine osservato che se il poro attraversasse tutte e due le membrane questo comporterebbe un collegamento diretto tra matrice e citosol, con conseguente rilascio di soluti di matrice ma certo non di

citocromo *c* ed altre proteine pro-apoptotiche intermembrana, rilascio che invece si osserva sperimentalmente.

E' importante quindi sottolineare che la transizione di permeabilità è prima di tutto un evento che coinvolge la membrana mitocondriale interna, e che i cambiamenti di quella esterna sono eventi secondari. Questo non significa che la membrana esterna non possa influenzare la probabilità di apertura del poro attraverso interazioni proteina-proteina, come evidenziato nella Fig. 5.

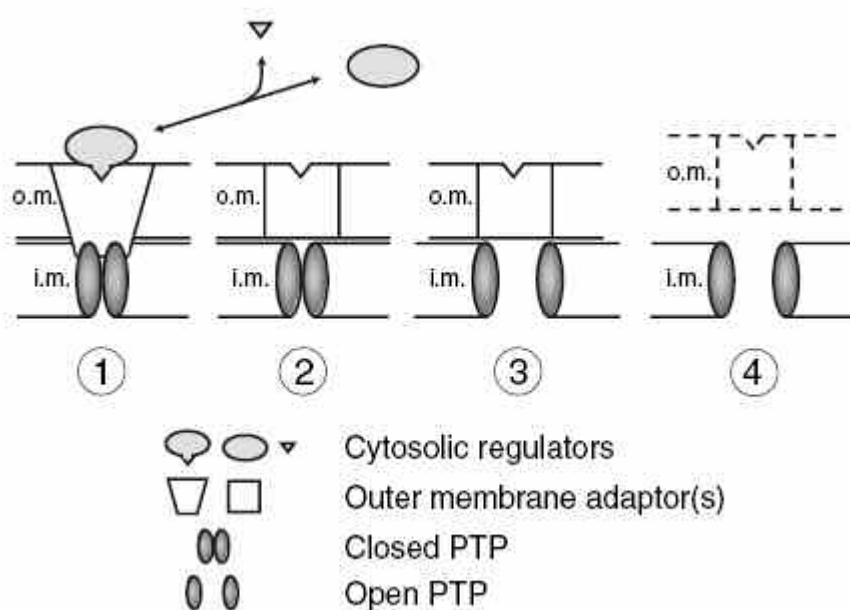


Fig. 5. **Modello per la regolazione del PTP da parte di proteine della membrana esterna.** (da Bernardi 2006)

Come si può vedere nello schema, le interazioni di una proteina della membrana esterna (come ad esempio VDAC o PBR) con il PTP, possono dipendere da una specifica conformazione conferita da regolatori citosolici a seguito di modificazioni a monte. Il legame tra la proteina e tali regolatori citosolici permetterebbero alle prime di interagire con il PTP stabilizzandolo così nella conformazione chiusa (pannello 1). In assenza di interazioni con la membrana esterna, il PTP può spostarsi da uno stato chiuso (pannello 2) ad uno aperto (pannello 3), sotto l'effetto di modulatori intermembrana e di matrice come ad esempio  $\Delta\Psi_m$ , pH, CyP-D,  $Ca^{2+}$  e piridin nucleotidi. La

stabilizzazione della conformazione aperta potrebbe portare al riarrangiamento della struttura delle cristae quindi alla rottura della membrane esterna (pannello 4).

## **2.5 La transizione di permeabilità in fisiopatologia**

La transizione di permeabilità è stata ampiamente documentata in vari modelli di colture cellulari. Attraverso l'uso della CsA e, più recentemente, attraverso lo studio di topi *Ppif*<sup>-/-</sup> sono stati fatti importanti passi avanti nella comprensione del ruolo della CyP-D (ed anche entro certi limiti del PTP), in modelli *in vivo* di malattia che vengono descritti qui di seguito.

### **2.5.1 Ischemia-riperfusion del miocardio**

La rilevanza della disfunzione mitocondriale nell'insorgenza di danni cardiaci irreversibili ha promosso numerosi studi volti a definire il coinvolgimento del PTP in particolare nel modello dell'ischemia-riperfusion. Nel cuore infatti, la funzione mitocondriale è coinvolta nell'improvvisa insorgenza di morte cellulare che si verifica quando viene ristabilito il flusso coronarico dopo un prolungato episodio ischemico (Halestrap *et al.*, 1998; Jennings e Ganote, 1976; Di Lisa *et al.*, 1998). In queste condizioni il parziale recupero della funzione mitocondriale (che si ha a seguito del ripristino del flusso) genera ATP sufficiente per la contrazione ma non per il rilascio muscolare, provocando ipercontratture e rottura del sarcolemma. Questa drammatica sequenza di eventi è prevenuta da inibitori della catena respiratoria e da disaccoppianti mitocondriali (Ganote *et al.*, 1976; Elz e Nayler, 1988), come pure dall'inibizione dell'utilizzazione dell'ATP da parte della ATPasi della miosina (Siegmund *et al.*, 1991). Questi dati indicano che il cuore potrebbe essere protetto dal danno ischemico se fosse possibile prevenire la disfunzione mitocondriale e che quindi il PTP rappresenta un target ideale per la cardioprotezione. Infatti, mentre l'ischemia di per se non causa apertura del poro, probabilmente grazie agli effetti protettivi dell'acidosi

intracellulare (Bond *et al.*, 1991, 1993), essa crea comunque le condizioni per l'apertura quando si va a riperfondere il cuore.

I primi dati sul ruolo chiave del PTP nel danno da riperfusione sono state ottenute in esperimenti su cardiomiociti e cuore perfuso, in cui la somministrazione di CsA riduceva i danni da ipercontrazione (Griffiths e Halestrap, 1993; Nazareth *et al.*, 1991). Dati sperimentali più diretti sono stati successivamente ottenuti grazie allo sviluppo di metodi per rilevare l'apertura del PTP in cellule intatte e tessuti. Tali metodi si basano sulla redistribuzione di molecole incapaci di attraversare la membrana mitocondriale interna a meno che non sia avvenuta la transizione di permeabilità. Un esempio è rappresentato dal 6-deossiglucosio, molecola che diventa permeante attraverso la membrana interna in seguito all'apertura del poro in cuori isolati dopo ischemia-riperfusione (Griffiths e Halestrap, 1995; Di Lisa e Bernardi, 1998). La perdita di vitalità dei miociti dopo ischemia-riperfusione, può inoltre essere prevenuta con l'uso di inibitori del PTP (Clarke *et al.*, 2002; Argaud *et al.*, 2005). Infine, un definitivo supporto al ruolo del PTP nella fisiopatologia cardiaca è stato ottenuto tramite l'osservazione che i topi mancanti di CyP-D sono meno suscettibili al danno ischemico (Baines *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2005).

### **2.5.2 Malattie epatiche**

L'effetto epatoprotettore della CsA è stato testato in numerosi modelli animali di malattia (vedi Bernardi, 2006 per una review). In questi modelli *in vivo* la dose di CsA variava dai 5 ai 100 mg/kg di peso corporeo, ed il tempo di somministrazione, dal pretrattamento con una singola dose a somministrazioni ripetute a differenti intervalli di tempo.

Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che, nel ratto, la massima inibizione del PTP nel fegato si ha tra le 2 e le 9 ore successive ad iniezione intraperitoneale di CsA 5 mg/kg per peso corporeo. Con questo trattamento si riesce ad avere completa protezione (almeno a tempi brevi) dalla epatotossicità da lipopolisaccaride di streptococco più D-galattosamina, la quale rende il fegato sensibile agli effetti proapoptotici del TNF- $\alpha$  (Soriano *et al.*, 2004).

Sempre nel ratto, il PTP è coinvolto anche in un modello di epatocarcinogenesi. L'alimentazione, di ratti con l'arilammina 2-acetilaminofluorene (AAF) provoca insorgenza di tumori epatici entro 30-50 settimane (Neumann *et al.*, 1994). La formazione di tumori è preceduta da una sequenza di alterazioni molto simili al decorso clinico dell'epatite cronica, con danno agli epatociti e fibrosi che progressivamente evolve in cirrosi. Il metabolismo epatico dell' AAF genera una grande varietà di composti, tra i quali il 2-nitrosofluorene, che in mitocondri isolati si comporta come un induttore del PTP (Klöhn *et al.*, 1998). Studi nel nostro laboratorio hanno dimostrato che entro le prime due settimane di dieta contenente AAF i mitocondri di fegato sviluppano un'aumentata resistenza all'apertura del PTP, in quanto si ha l'instaurarsi di una risposta adattativa, che oltre a desensibilizzare il PTP, protegge i ratti dagli effetti epatotossici del trattamento con lipopolisaccaride più D-galattosammina (Klöhn *et al.*, 2003). Tale risposta, di natura epigenetica, rappresenta quindi una forma di promozione tumorale centrata sui mitocondri (in particolare sul PTP).

Una promettente applicazione della CsA, basata sull'inibizione del PTP, è la conservazione del fegato durante i trapianti d'organo. È stato infatti dimostrato, che la CsA fornisce una parziale protezione durante il processo di conservazione a freddo-riperfusione a caldo, suggerendo così, che il PTP possa avere un ruolo nella perdita di funzionalità che il fegato subisce durante il periodo di conservazione preimpianto (Plin *et al.*, 2004).

### **2.5.3 Malattie neuronali**

Molti disordini del sistema nervoso sono provocati o aggravati dalla disfunzione mitocondriale. Focalizzando l'attenzione sul PTP, ci sono dati convincenti che quest'ultimo abbia un ruolo in neuropatologia. Tali risultati si basano sul ruolo protettivo della CsA a seguito di danno cerebrale indotto da vari stimoli (vedi Bernardi, 2006 per una review). In aggiunta, i topi *Ppif*<sup>-/-</sup> mostrano una diminuzione di danno a seguito di ischemia cerebrale e riperfusione, stabilendo così che l'effetto neuroprotettivo della CsA non è dovuto all'inibizione della calcineurina (Schinzel *et al.*, 2005).

Un'altra interessante osservazione è che la CsA prolunga la sopravvivenza in un modello murino di sclerosi laterale amiotrofica (Keep *et al.*, 2001; Karlsson *et al.*, 2004), effetto che è anche esercitato dalla minociclina attraverso l'inibizione del PTP (Zhu *et al.*, 2002).

Altri effetti neuroprotettivi riconducibili al poro sono stati ottenuti con la melatonina a seguito di ischemia cerebrale e riperfusione (Andrabi *et al.*, 2004), con la prometazina in un modello murino di ictus cerebrale (Stavrovskaya *et al.*, 2004) e con l'uso di topiramato nell'epilessia indotta da pilocarpina (Kudin *et al.*, 2004).

Recentemente è stato dimostrato in collaborazione con il nostro laboratorio che i topi *Ppif*<sup>-/-</sup> riescono parzialmente a guarire a seguito di induzione di encefalomielite autoimmune, un modello murino di sclerosi multipla (Forte *et al.*, 2007).

Questa serie di risultati suggerisce quindi che il PTP sia un target farmacologico importante nelle malattie neurologiche.

#### **2.5.4 Malattie muscolari**

L'ipotesi che la disfunzione mitocondriale Ca<sup>2+</sup>-dipendente potesse giocare un ruolo importante nelle distrofie muscolari era stata proposta già 30 anni fa (Wrogemann e Pena, 1976). Successivamente è stato dimostrato che la transizione di permeabilità ha un ruolo chiave nella patogenesi della distrofia muscolare in un modello murino di deficienza da collagene VI (Irwin *et al.*, 2003). Nell'uomo, le mutazioni del gene che codifica per il collagene VI causano due tipi principali di distrofia muscolare: la miopatia di Bethlem (Jöbssis *et al.*, 1996), e la grave distrofia muscolare congenita di Ullrich (Camacho *et al.*, 2001).

Topi privi di collagene VI (*Col6a1*<sup>-/-</sup>), hanno un fenotipo muscolare molto simile alla miopatia di Bethlem, con perdita di forza contrattile associata ad alterazione dell'ultrastruttura del reticolo sarcoplasmatico e dei mitocondri, con aumento dell'apoptosi spontanea (Bonaldo *et al.*, 1998). Questi difetti sono causati da una inappropriata apertura del PTP, e possono essere normalizzati tramite trattamento con CsA, che permette il recupero dell'ultrastruttura muscolare normale e diminuisce in modo significativo il

numero di nuclei apoptotici *in vivo*. La CsA rappresenta quindi, il primo trattamento farmacologico mai realizzato in un modello animale di malattia muscolare genetica (Irwin *et al.*, 2003; Bonaldo *et al.*, 1998). Nel nostro laboratorio è stato recentemente dimostrato che gli stessi difetti si riscontrano in colture di mioblasti di pazienti affetti da distrofia muscolare di Ullrich, scoperta che ha aperto la via ad un trial clinico pilota (Angelin *et al.*, 2007).

L'insieme di questi dati suggerisce che la disfunzione mitocondriale mediata dal PTP potrebbe essere una componente, (se non una causa determinante) anche in altre malattie muscolari con alterazione dell'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$ , come ad esempio la distrofia di Duchenne.

## **2.6 Identificazione di nuovi inibitori del PTP**

Abbiamo visto come la transizione di permeabilità sia un evento che può spiegare il coinvolgimento dei mitocondri in molte condizioni patologiche. Tuttavia, il ruolo del PTP nei meccanismi che portano a morte cellulare, così come la natura molecolare di quest'ultimo rimangono in gran parte oscuri. Questo si deve a numerosi fattori, che vanno dalla complessità intrinseca della modulazione del PTP al fatto che il verificarsi della transizione di permeabilità *in vivo* deve essere dedotta da dati indiretti, che spesso portano a problemi interpretativi dei risultati sperimentali. Un problema nel problema è la mancanza di persistenza d'azione della CsA che può condurre a risultati negativi (cioè a mancata inibizione) anche quando il PTP potrebbe essere effettivamente coinvolto. Una strategia per aumentare la comprensione dei meccanismi in cui è coinvolta la transizione di permeabilità, è l'identificazione di nuovi composti che abbiano come bersaglio il PTP stesso. Per questo motivo, è stato messo a punto, in collaborazione con la Genextra S.p.A. di Milano, un sistema di screening di librerie di composti chimici che ha permesso l'identificazione di nuovi inibitori del PTP ad alta affinità. La successiva caratterizzazione di due di questi composti ha rappresentato quindi lo scopo di questa tesi.

### 2.6.1 Screening primario

Per l'identificazione di inibitori del PTP, è stato utilizzato un sistema di screening basato sul rigonfiamento mitocondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente schematizzato in Fig. 6. I mitocondri, in presenza di un'adeguata concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  tendono a rigonfiarsi con conseguente diminuzione della torbidità e quindi dell'assorbanza della sospensione. In presenza di un inibitore del PTP invece (come è il caso della CsA riportata in figura), non si assiste al calo dell'assorbanza in quanto il poro rimane chiuso.

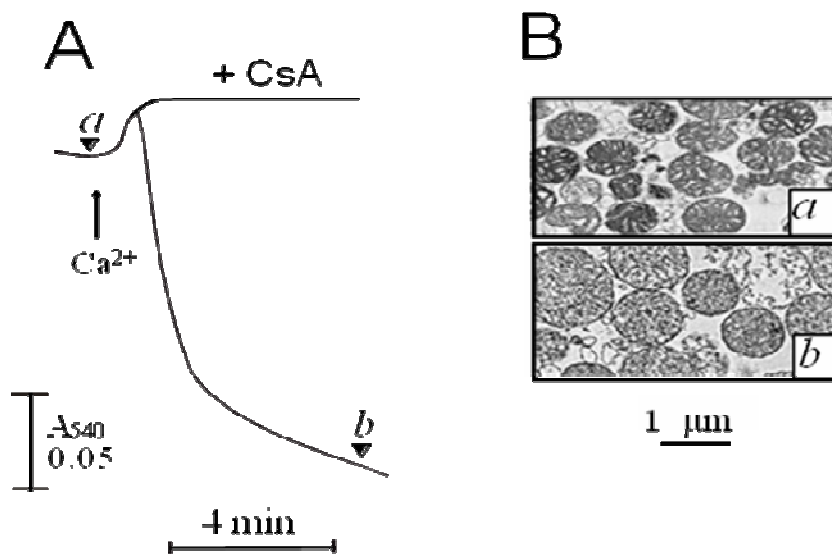


Fig. 6. **Metodo utilizzato per l'identificazione di inibitori del PTP.** Nel **pannello A** si possono vedere le tracce dell'assorbanza, mentre nel **pannello B** è presente la micrografia elettronica presa ai punti indicati *a* e *b*. (modificata da Petronilli *et al.*, 1994)

E' ovviamente impensabile, poter "screenare" un'intera libreria di composti con un normale spettrofotometro. Per questo motivo la Genextra S.p.A. di Milano ha messo a punto un nuovo sistema di screening HTS (high throughput screen) basato sull'uso di piastre multipozzetto come quella schematizzata in Fig. 7. In tali piastre, da 1536 pozzetti, con un sistema robotizzato vengono posti i mitocondri (alla concentrazione di 1mg/ml, con volume finale di 10  $\mu\text{L}$ ), in presenza dei diversi composti da testare (in ogni pozzetto un differente composto, ad eccezione di quelli colorati che rappresentano i controlli positivi e negativi come descritto nella didascalia della Fig. 7). Ad ogni pozzetto viene aggiunta una concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  in



grado di indurre apertura del PTP *per se*. In queste condizioni, come già accennato, si ha un calo di assorbanza dovuto a rigonfiamento mitocondriale. Calo che non si verifica se è presente un inibitore del poro.

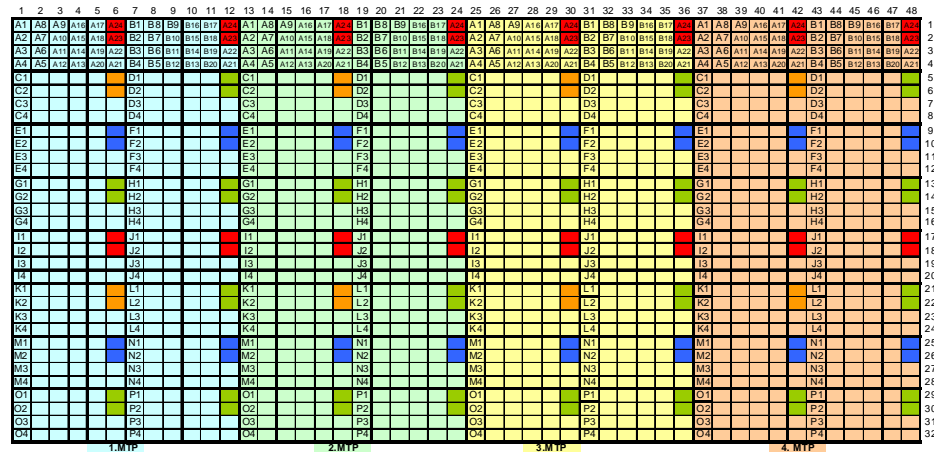


Fig. 7. **Piastre multipozzetto utilizzate per l'HTS.** I pozzetti in rosso rappresentano i controlli positivi (+CsA), quelli blu rappresentano i controlli negativi (no CsA), quelli verdi contengono solo il solvente (DMSO), mentre quelli arancioni solo il buffer. In tutti gli altri pozzetti è presente un differente composto da saggiare.

Tale situazione è schematizzata in Fig. 8, nella quale ciascuna linea rappresenta un singolo pozzetto. A sinistra, prima dell'aggiunta di calcio l'assorbanza è elevata, per poi calare in presenza del calcio ad eccezione dei pozzetti in cui è presente un inibitore del PTP (nello specifico nella Fig. 8 l'inibitore in questione è la CsA alla concentrazione di 1µM).

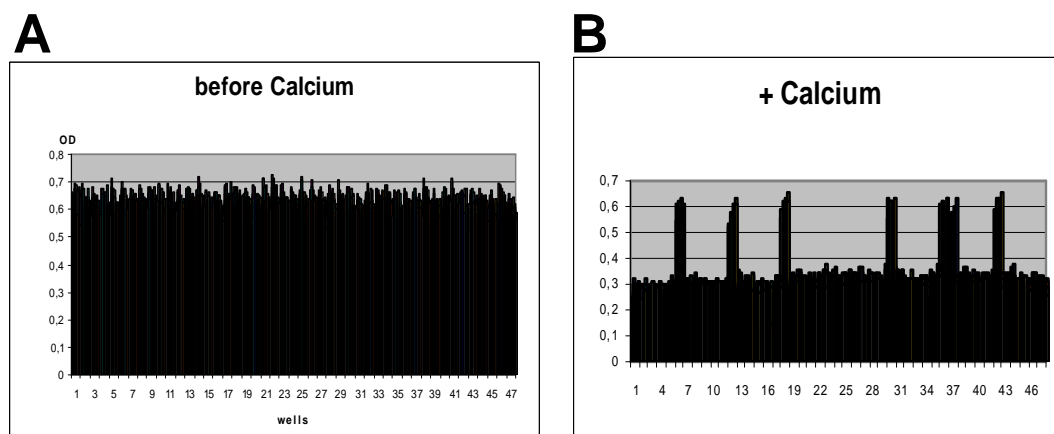


Fig. 8. **Variazione dell'assorbanza all'aggiunta di  $\text{Ca}^{2+}$ .** Nel **pannello A** sono schematizzati i valori di assorbanza prima dell'aggiunta di  $\text{Ca}^{2+}$ , mentre nel **pannello B** quelli dopo l'aggiunta.

Da questo screening sono emersi 8 composti o "hits" primari. La caratterizzazione di due di questi composti, denominati CngPtP003 e CngPtP006 (le cui strutture molecolari sono rappresentate in Fig. 9) ha rappresentato poi l'argomento di questa tesi.

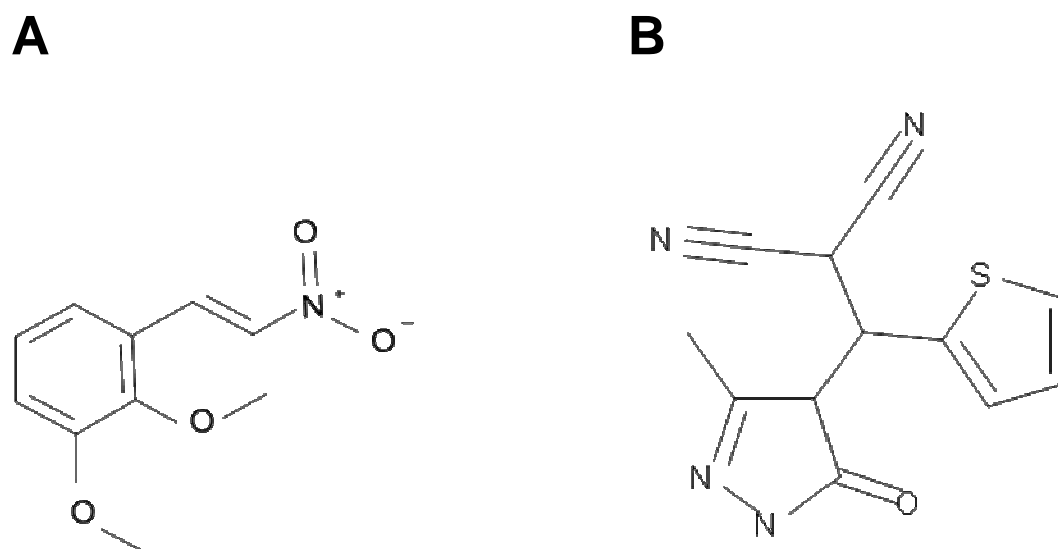


Fig. 9. **Struttura molecolare di CngPtP003 (pannello A) e CngPtP006 (pannello B).**

## 2.6.2 Screening secondario

Da uno screening come quello appena descritto possono emergere anche “falsi positivi”, rappresentati da disaccoppianti ed inibitori della respirazione mitocondriale. Infatti entrambe queste classi di composti causano depolarizzazione, che previene l'accumulo di  $\text{Ca}^{2+}$  da parte dei mitocondri. Potrebbero essere presenti inoltre composti che inibiscono il trasporto stesso del  $\text{Ca}^{2+}$  nei mitocondri bloccando il canale (uniporto) del  $\text{Ca}^{2+}$ . Per questo motivo, i composti positivi allo screening primario sono stati testati ulteriormente con il saggio della rodamina123 e del Calcium-Green.

La rodamina123 (Rho123) è una sonda fluorescente utilizzata per misurare le variazioni del potenziale di membrana in mitocondri isolati. Si può osservare dal grafico esemplificativo di Fig. 10, come mitocondri energizzati (MLM: mouse liver mitochondria) accumulino la sonda con conseguente diminuzione (quenching) del segnale di fluorescenza. A questo punto l'aggiunta di un composto disaccoppiante, come ad esempio il protonoforo FCCP, o in grado di inibire la respirazione (non mostrato) causa depolarizzazione di membrana con conseguente rilascio della sonda ed aumento della fluorescenza.

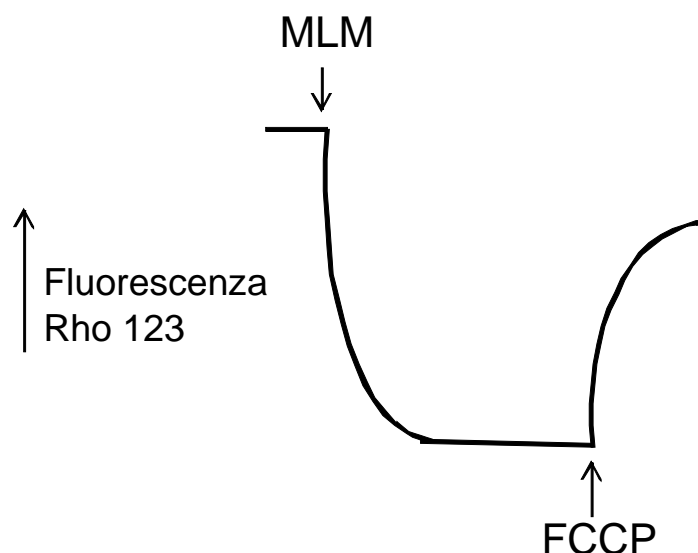


Fig. 10. Studio del potenziale di membrana in mitocondri isolati con Rho 123.

Da come si può vedere in Fig. 11 entrambi i composti, CngPtP003 e CngPtP006, non vanno ad alterare il potenziale di membrana alle concentrazioni oggetto di studio.

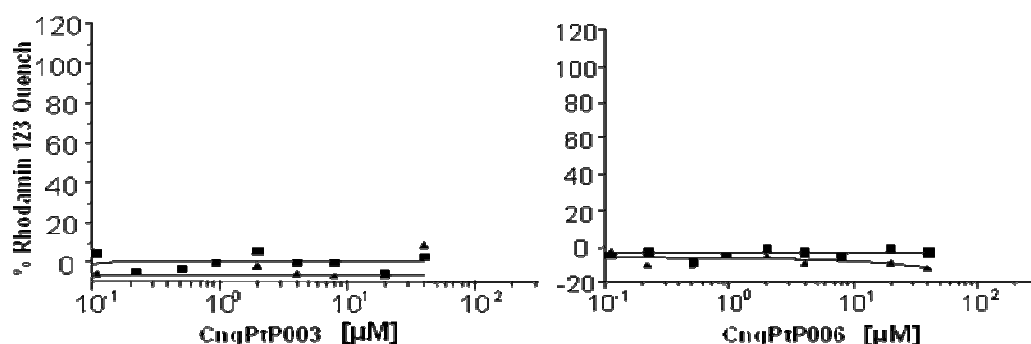


Fig. 11. **Effetto di CngPtP003 e CngPtP006 sul test della rodamina.** I simboli (■) e (▲) si riferiscono a due differenti misurazioni.

Come già detto, altri composti che possono dare una risposta positiva allo screening primario sono quelli che impediscono il trasporto stesso di  $\text{Ca}^{2+}$  dentro i mitocondri. Tali composti vengono però facilmente individuati tramite l'uso della sonda Calcium-Green 5N. Questa sonda non è di per sé fluorescente ma lo diventa quando si lega al calcio extramitocondriale, formando un complesso che emette a 530 nm. Incubando quindi i mitocondri con il Calcium-Green 5N e il composto da testare, e successivamente aggiungendo  $\text{Ca}^{2+}$  si riesce, seguendo la variazione della fluorescenza, a vedere se questo viene o meno accumulato dai mitocondri.

Come si può vedere dalla Fig. 12, il composto CngPtP003 mostra un debole effetto inibitorio sull'accumulo di  $\text{Ca}^{2+}$  per concentrazioni superiori a 10 μM, mentre il composto CngPtP006 non ha nessun effetto.

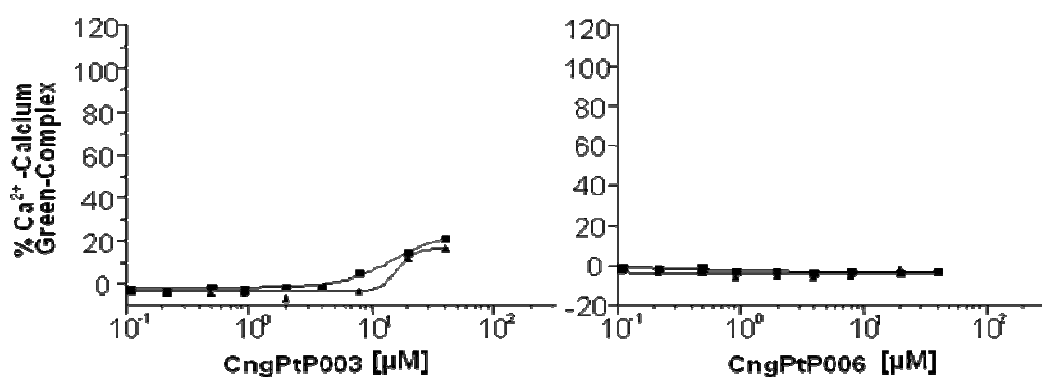


Fig. 12. Effetto di CngPtP003 e CngPtP006 sul test del Calcium-Green 5N. I simboli (■) e (▲) si riferiscono a due differenti misurazioni.

In conclusione, tramite questo nuovo tipo di screening HTS, sono stati ottenuti 8 nuovi inibitori ad alta affinità del PTP. Due di questi, i composti denominati CngPtP003 e il CngPtP006, sono stati caratterizzati per quanto riguarda le loro proprietà chimico-biologiche sia in mitocondri isolati che in cellule intatte durante il mio dottorato di ricerca.



### ***3. SCOPO DELLA TESI***

I mitocondri, e in particolare il PTP, hanno importanti implicazioni in fisiopatologia. Tuttavia, il ruolo di quest'ultimo nei meccanismi che portano a morte cellulare, così come la sua natura molecolare, rimangono in gran parte elusivi. Quindi, una strategia per aumentare la comprensione dei meccanismi in cui è coinvolta la transizione di permeabilità, è l'identificazione di nuovi composti che abbiano come bersaglio il PTP stesso. Per questo motivo, è stato messo a punto, in collaborazione con la Genextra S.p.A. di Milano, un sistema di screening di librerie di composti chimici che ha permesso l'identificazione di nuovi inibitori del PTP ad alta affinità. La successiva caratterizzazione degli effetti biologici di due di questi composti, denominati CngPtP003 e CngPtP006 ha rappresentato quindi lo scopo di questa tesi di Dottorato.





## **4. MATERIALI E METODI**

### **4.1 Studi in mitocondri isolati**

#### **4.1.1 Preparazione di mitocondri di fegato di topo**

I mitocondri sono stati ottenuti mediante centrifugazione differenziale di sospensioni di omogenato di fegato di topi CD1. L'organo viene isolato e trasferito in un mezzo, (MLM buffer) contenente KCl 125 mM, Tris-HCl 10 mM, a pH 7,40, EGTA-Tris 1 mM, mantenuto freddo in un bagno di ghiaccio. Il fegato viene lavato, sminuzzato con le forbici in piccoli frammenti e, infine, omogenizzato utilizzando un omogenizzatore Potter provvisto di pestello in teflon. Tutti questi passaggi vengono effettuati a circa 4° C mantenendo il contenitore in un bagno di acqua e ghiaccio. L'omogenato viene diluito a 200 ml e le cellule rimaste integre, i nuclei ed eventuali frammenti di tessuto vengono fatti sedimentare a 700 x g per 10 minuti in una centrifuga ALC PM 180 R refrigerata a 4°C. Il supernatante che così si forma viene separato dal pellet e centrifugato nuovamente a 7000 x g per 10 minuti nella stessa centrifuga. Il supernatante viene eliminato e il pellet contenente i mitocondri viene accuratamente risospeso e nuovamente centrifugato come sopra. Il pellet mitocondriale, risultante da quest'ultima centrifugazione, viene risospeso in un piccolo volume utilizzando sempre lo stesso mezzo. La concentrazione proteica mitocondriale viene determinata mediante la reazione del biureto.

#### **4.1.2 Preparazione di mitocondri da cellule HeLa**

Due giorni prima dell'esperimento 5 fiasche Falcon T150 a confluenza sono state espanse in altrettante piastre NUNC 24x24. Le cellule, staccate con lo scraper, venivano risospese in MLM buffer e centrifugate a 600 g x 5 minuti a 4 °C. Il pellet è stato risospeso in MLM buffer e trasferito in potter da 7 ml. Le cellule sono state rotte utilizzando un omogeneizzatore Potter

provvisto di pestello in teflon e centrifugate a 600 g x 10 minuti. Il surnatante è stato centrifugato a 7000 g x 10 minuti e il pellet così ottenuto è stato risospeso in MLM buffer e centrifugato nuovamente a 7000 g x 10 minuti. Il pellet contenente la frazione mitocondriale viene risospeso in un minimo volume di buffer. La concentrazione proteica viene determinata tramite reazione del Bradford.

#### ***4.1.3 Misurazione della concentrazione di $Ca^{2+}$ extramitocondriale***

La concentrazione di  $Ca^{2+}$  extramitocondriale è stata misurata fuorimetricamente utilizzando la sonda Calcium Green-5N (λecc 505 nm, λem 535 nm) ad una concentrazione di 1 μM. Questa sonda, non fluorescente di per sé, lo diventa in presenza di  $Ca^{2+}$ , al quale si lega con una  $K_D$  di 14 μM. Le variazioni di fluorescenza sono state rilevate mediante spettrofluorimetro Perkin-Elmer® LS-50B dotato di agitazione magnetica e termostato a 25 °C. Il Calcium Green-5N è impermeabile alle membrane e aggiunto ad una sospensione mitocondriale permette di monitorare la concentrazione di  $Ca^{2+}$  nel mezzo extramitocondriale e di conseguenza seguire l'accumulo o il rilascio di  $Ca^{2+}$  dai mitocondri.

#### ***4.1.4 Misurazione della capacità dei mitocondri isolati di ritenere $Ca^{2+}$***

La Calcium Retention Capacity (CRC) è definita come la quantità di  $Ca^{2+}$  che i mitocondri riescono ad accumulare prima di rilasciarlo per apertura del PTP.

Questa è stata determinata seguendo l'andamento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  extramitocondriale in risposta ad aggiunte ripetute di  $Ca^{2+}$  10 μM ad una sospensione di mitocondri (0,5 mg x ml<sup>-1</sup>) ad intervalli di 1 minuto. I mitocondri sono stati incubati in una cuvetta termostata a 25 °C in 2 ml di mezzo in presenza di Calcium Green-5N 1 μM. Il mezzo utilizzato conteneva

KCl 125 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Tris 1 mM, tris-MOPS 10 mM, EGTA-Tris 40 μM, glutammato-Tris 5 mM e malato-Tris 2,5 mM.

#### **4.1.5 Misurazione del consumo di ossigeno**

La misura del consumo di ossigeno è stata determinata con un elettrodo ad ossigeno di tipo Clark, costituito da un catodo (un filo di platino o d'oro rivestito di vetro o di plastica) e da un anodo (filo d'argento) immersi nella stessa soluzione satura di KCl e separati dalla soluzione in esame da una membrana permeabile all'ossigeno. L'elettrodo è alloggiato in una cameretta chiusa da un tappo di vetro smerigliato munito di foro aghiforme per aggiungere i reagenti senza che l'ossigeno possa diffondere. La temperatura della cameretta di incubazione è termostata a 25°C. Prima di ogni esperimento il mezzo di reazione (lo stesso impiegato nella misurazione della CRC) è stato posto nella cameretta stessa e lasciato equilibrare sotto agitazione, quindi la camera è stata chiusa con il tappo a smeriglio.

Agli elettrodi viene applicata una differenza di potenziale di 0.7 Volt, in modo tale che il catodo di platino sia negativo rispetto all'anodo d'argento.

Al catodo si riduce l'ossigeno secondo le reazioni:



La tensione dell'ossigeno al catodo tende perciò a zero e questo promuove la diffusione del gas dalla soluzione all'elettrodo. Dal momento che il passaggio limitante del processo di riduzione è la velocità di diffusione dell'ossigeno attraverso la membrana, la corrente che viene prodotta dall'elettrodo è proporzionale alla tensione dell'ossigeno nel campione.

Il consumo di ossigeno è stato determinato sospendendo i mitocondri nello stesso mezzo di incubazione usato per la determinazione della CRC e nell'apposita cameretta, in condizioni basali (stato 4), in presenza di ADP, il quale fa aumentare il consumo di ossigeno perché stimolando la sintesi di ATP stimola anche l'attività della catena respiratoria (stato 3), e in presenza dell'agente disaccoppiante dinitrofenolo (DNF), che, inducendo una

depolarizzazione della membrana mitocondriale interna, obbliga la catena respiratoria ad aumentare la propria attività per compensare lo squilibrio creatosi (respirazione massimale o disaccoppiata). I composti da testare sono invece stati aggiunti nella cameretta prima dell'inizio dell'esperimento e la velocità della respirazione è stata valutata calcolando le pendenze dei grafici (mV vs tempo) di ogni singola fase della respirazione.

#### **4.1.6 Misurazione della variazione del volume mitocondriale**

La misurazione dei cambiamenti di volume della matrice mitocondriale è stata determinata mediante un rilevamento a 545 nm della deviazione della luce per mezzo di uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer 650-40 in cuvette termostatate e con agitatore magnetico. Questa metodologia si basa sul fatto che all'aumento del volume dei mitocondri corrisponde una minore rifrazione della luce e una diminuzione della torbidità della sospensione (Petronilli *et al.*, 1993a).

#### **4.1.7 Misurazione della resistenza al lavaggio dei composti**

Due sospensioni mitocondriali alla stessa concentrazione (0.5 mg x ml<sup>-1</sup>) sono state trattate rispettivamente con il composto in analisi o con solo solvente e lasciati ad incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Le sospensioni sono state quindi centrifugate a 7000 g x 6 minuti e il pellet così ottenuto lavato con MLM Buffer e centrifugato nuovamente a 7000 g x 6 minuti. I mitocondri così ottenuti sono stati risospesi in un opportuno volume e saggiati per la CRC.

## **4.2 Studi in cellule in coltura.**

### **4.2.1 Colture cellulari**

Sono state utilizzate cellule HeLa (cellule di carcinoma della cervice uterina). Le cellule sono state conservate a -80°C usando come agente crioprotettivo DMSO ad una concentrazione finale del 10%. Lo

scongelo avveniva a 37°C in un bagno termostato e dopo diluizione di 10 volte con terreno di coltura DMEM . La sospensione veniva centrifugata a 200 x g per 5 minuti al fine di rimuovere l'agente crioprotettivo. Il supernatante veniva aspirato ed il pellet, contenente le cellule, risospeso in 10 ml del medesimo terreno di coltura. Le cellule venivano fatte crescere in fiasche per colture cellulari in incubatore (a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5%) in terreno DMEM (Gibco cat. N 41966) supplementato con FCS 10%, glutammina 5mM, penicillina/streptomina, fino a confluenza. Le cellule venivano quindi trattate con una minima quantità di soluzione di EDTA (0,02% p/v) e tripsina (0,05% p/v) per staccarle dal fondo delle fiasche e successivamente addizionate con 10 volumi del mezzo di coltura per neutralizzare l'azione della tripsina. La sospensione ottenuta veniva distribuita in piastre sterili da 6 o 24 pozzetti, all'interno dei quali, quando necessario, era stato precedentemente introdotto un vetrino copri-oggetto di 24 o 13 mm di diametro. Le cellule venivano quindi lasciate crescere per 2 giorni in incubatore, prima di effettuare gli esperimenti al microscopio ad epifluorescenza. A tal fine i vetrini venivano trasferiti in apposite camerette porta-vetrino e le cellule venivano mantenute in presenza di soluzione salina fisiologica (HBSS Sigma H-1387) tamponata con 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4.

#### **4.2.2 Microscopia ad epifluorescenza**

Le immagini in epifluorescenza sono state acquisite utilizzando un microscopio invertito (Olympus 1X71/1X51 con sorgente di luce a xenon) dotato di illuminazione per epifluorescenza, di telecamera raffreddata CCD e di appropriati filtri di eccitazione e di emissione. Le immagini di fluorescenza della tetrametilrodamina metil estere (TMRM) sono state acquisite ogni minuto con un tempo di esposizione di 30 msec e una intensità di segnale di 24 %, usando un obiettivo 40X 1,35 NA ad olio per le cellule, e filtri  $\lambda_{ecc}= 568 \pm 25$  nm *bandpass* e  $\lambda_{emiss}= 585$  nm *longpass*. Le immagini sono state memorizzate ed analizzate usando il programma CellR (Olympus).

### 4.2.3 Studio delle variazioni del $\Delta\psi_m$ in cellule

La TMRM (Molecular Probes, cat. N. T-668), è una molecola fluorescente solubile in DMSO e metanolo. Ha una lunghezza d'onda di eccitazione a 548 nm e un picco di emissione a 573 nm. Essa si accumula nei mitocondri in quanto molecola lipofila carica positivamente, attratta elettroforeticamente nella matrice mitocondriale dal  $\Delta\psi_m$ , e si equilibra tra interno ed esterno in base all'equazione di Nernst:

$$\Delta\psi_m = RT/zF \ln [TMRM]_i / [TMRM]_o$$

Per visualizzare le immagini al microscopio ad epifluorescenza sono stati utilizzati gli obiettivi 40X; le cellule sono state tenute in incubatore per 2 giorni su vetrini coprioggetto da 24 mm di diametro che sono stati poi trasferiti in apposite camere aperte per essere montati sul piano del microscopio invertito. Il caricamento delle cellule con 20 nM TMRM prevede un'incubazione di 30 minuti a 37°C in HBSS. Il trattamento con 1 µg/ml CsA è stato effettuato durante il caricamento poiché la CsA è un inibitore delle pompe MDR, o glicoproteine P, responsabili dell'estrusione di sostanze esogene, come la TMRM, dalle cellule. Negli esperimenti condotti in assenza di CsA, questa è stata sostituita con 2 µg/ml di ciclosporina H (Csh), un suo analogo che non inibisce il PTP ma è attivo sulle pompe MDR.

Al termine dei 30 minuti le cellule sono state lasciate equilibrare per 15 minuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce prima di cominciare l'acquisizione delle immagini al microscopio come descritto prima. Nella Fig. 13A è possibile osservare un esempio di colture di cellule HeLa caricate con TMRM come descritto sopra, mentre nella Fig. 13A' è possibile osservare l'effetto del trattamento delle cellule con FCCP, un protonoforo che depolarizza i mitocondri causando rilascio della sonda fluorescente.

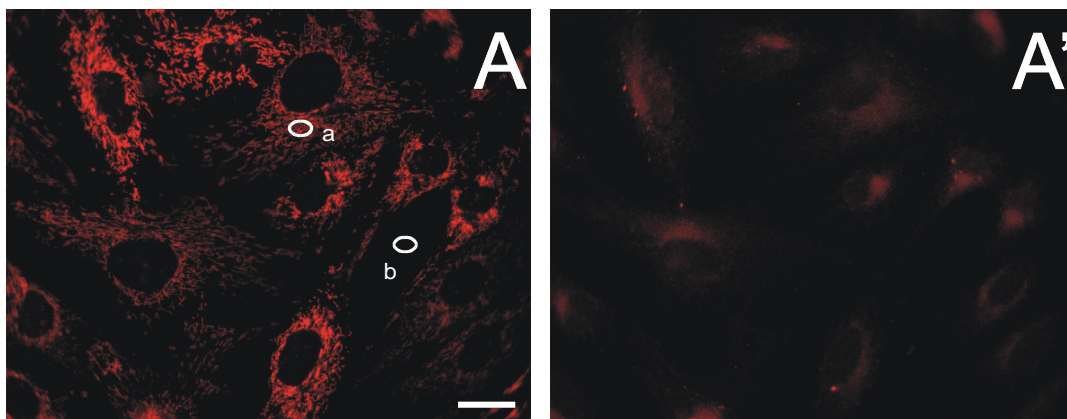


Fig. 13. **Immagini di fluorescenza di cellule caricate con TMRM: effetto della depolarizzazione mitocondriale.** Cellule HeLa trattate con CsH e caricate con TMRM. Le immagini sono state visualizzate con un microscopio ad epifluorescenza. L'immagine del pannello A è stata acquisita dopo il caricamento con la sonda, e l'immagine del pannello A' dopo 15 min dall'aggiunta di 4  $\mu\text{M}$  FCCP, protonoforo che induce depolarizzazione, evidenziata dal rilascio della sonda dai mitocondri. Barra 20  $\mu\text{m}$ . La regione cerchiata "a" rappresenta la regione ricca di mitocondri su cui valutare i cambiamenti di fluorescenza, quella "b" corrisponde alla regione *background*.

#### **4.2.4 Analisi delle immagini ottenute con la TMRM**

Le regioni di interesse sono quelle ricche di mitocondri (ROIs), mentre le regioni prive di cellule sono il nostro *background* (nella Fig. 13A le regioni cerchiata "a" e "b" ne sono un esempio). Le variazioni d'intensità di fluorescenza della TMRM durante il trattamento con i vari agenti sono state analizzate come cambiamento medio di tutte le ROIs prese in esame, meno il *background*. Dal momento che i valori iniziali di fluorescenza possono essere un po' diversi nelle varie ROIs, la fluorescenza media è stata riportata come percentuale dei valori iniziali.

#### **4.2.5 Misurazione della CRC di cellule HeLa permeabilizzate**

La permeabilizzazione delle cellule viene ottenuta tramite trattamento con il detergente Digitonina. Indicativamente 20 milioni di cellule vengono precipitate centrifugando a 1200 rpm x 7 minuti. Si risospende in PBS e si ricentrifuga nelle stesse condizioni. Il pellet così ottenuto viene risospeso in un mezzo contenente KCl 130 mM, MOPS-Tris 10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Tris 1 mM

portato a pH 7,4 al quale viene aggiunta Digitonina 150  $\mu\text{M}$  / EGTA 1 mM. Il tutto viene tenuto in ghiaccio per 15 minuti. Si diluisce a 10 ml con lo stesso buffer contenente EGTA 0.1 mM, si centrifuga e si risospende in 500  $\mu\text{L}$  dello stesso mezzo. Le cellule così permeabilizzate vengono saggiate con il test della CRC precedentemente descritto, ad eccezione che le aggiunte di  $\text{Ca}^{2+}$  vengono eseguite ogni 2 minuti, ponendo in cuvetta 100  $\mu\text{L}$  di soluzione contenente le cellule digitonizzate.

#### **4.2.6 Determinazione della morte cellulare**

Le cellule che muoiono per apoptosi espongono precocemente sul foglietto esterno della membrana plasmatica la fosfatidilserina (PS), che normalmente si trova in quello interno (Fadok *et al.*, 1992). L'annessina-V, coniugata con il fluoroforo FLUOS (Roche Molecular Biochemicals), si lega alla fosfatidilserina in modo  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente. Quando la PS viene esposta sul foglietto esterno della membrana plasmatica in corso di apoptosi, l'annessina-V marcata con il fluoroforo si lega alla PS e rende così riconoscibile la cellula apoptotica, che si può visualizzare al microscopio ad epifluorescenza tramite il fluoroforo associato all'annessina-V. Bisogna però ricordare che anche durante la necrosi l'annessina può raggiungere e legare la fosfatidilserina poiché l'annessina riesce comunque a raggiungere la fosfatidilserina all'interno della cellula quando la membrana plasmatica perde la sua integrità. Per distinguere l'apoptosi dalla necrosi le cellule sono state quindi incubate anche con Sytox Orange (Molecular Probes S11368). Il Sytox non attraversa normalmente le membrane cellulari, ma è in grado di marcare il nucleo delle sole cellule necrotiche, nelle quali la permeabilità della membrana plasmatica è aumentata. Quindi le cellule marcate con Sytox (rosso) sono necrotiche, quelle marcate solo con annessina (verde) sono apoptotiche, mentre quelle che non presentano nessun tipo di marcatura sono cellule sane. La fluorescenza dell'annessina-V e del Sytox associata alle cellule è stata acquisita al microscopio ad epifluorescenza utilizzando rispettivamente i filtri della fluoresceina (verde, eccitazione/emissione 488/525 nm) e della TMRM (rosso, eccitazione/emissione 568/585 nm).



Cellule HeLa (40 mila) cresciute per due giorni in piastre da 24 pozzetti sono state incubate con CngPtP003 o con Debio-025 (Debiopharm, Losanna), o con solo solvente per 20 minuti, e successivamente trattate con Acido Arachidonico 50  $\mu\text{M}$  per 90 minuti. Immediatamente dopo i trattamenti ciascun pozzetto è stato incubato per 15 min a 25 °C con 0.1  $\mu\text{M}$  Sytox e annessina-V-FLUOS (Roche Molecular Biochemicals) ad una diluizione finale di 1:25 (v/v). Sono state così acquisite le immagini fluorescenti dell'annessina-V e del Sytox, rispettivamente, e le immagini in campo chiaro in 3 campi selezionati a caso in ciascun pozzetto. Le 3 immagini (rosso, verde e campo chiaro) sono state sovrapposte usando l'appropriata funzione del programma CellR (vedi Fig. 14 per un esempio). A questo punto le cellule di ciascun campo sono state contate e classificate come apoptotiche se positive solo all'annessina (verde), necrotiche se positive anche al Sytox (rosso), annotando il numero di cellule in una e nell'altra condizione rispetto al numero totale di cellule in quel campo.

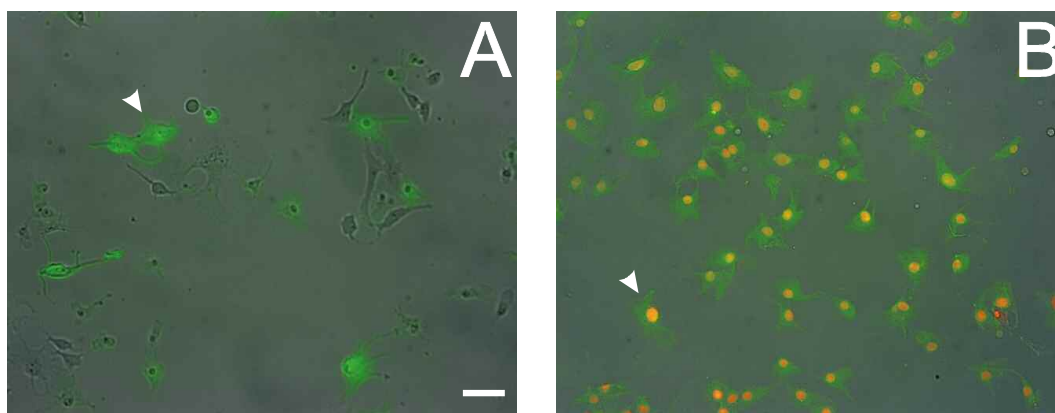


Fig. 14. **Esempio di marcatura delle cellule con annessina-V e Sytox Orange.** Cellule HeLa sono state incubate con 75  $\mu\text{M}$  acido arachidonico per 30 min (pannello A) o per 1,5 h (pannello B), marcate con annessina-V e Sytox Orange e le loro immagini acquisite, come descritto, con un microscopio ad epifluorescenza. Le *punte di freccia* nei pannelli A e B indicano rispettivamente una cellula annessina-V positiva e una cellula annessina-V-Sytox positiva. *Barra*, 20  $\mu\text{m}$ .



## **5. RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **5.1 Caratterizzazione degli effetti mitocondriali degli inibitori.**

Una volta individuati gli inibitori dallo screening, come prima cosa si è proceduto alla caratterizzazione dei loro effetti sui mitocondri isolati. Era importante a questo punto infatti, confermare le loro proprietà inibitorie sul PTP tramite il saggio della CRC e verificarne l'assenza di tossicità, soprattutto nell'intervallo di concentrazioni di utilizzo, attraverso lo studio del loro effetto sulla respirazione mitocondriale. Tutta la caratterizzazione degli effetti mitocondriali dei composti è stata eseguita su mitocondri isolati da fegato di topi CD1 preparati secondo la procedura descritta in Materiali e Metodi.

#### **5.1.1. Caratterizzazione degli effetti mitocondriali di CngPtP003**

La prima proprietà testata sistematicamente per ciascun composto è stata la capacità di inibire il PTP, che è stata studiata tramite il saggio della Calcium Retention Capacity (CRC) la cui procedura è descritta nei Materiali e Metodi. Come già accennato, essa è definita come la quantità di  $Ca^{2+}$  che i mitocondri riescono ad accumulare in presenza di fosfato prima di rilasciarlo attraverso l'apertura del PTP.

Una buona parte dei dati sperimentali di questa tesi riguarda quindi misure di CRC, e molto spesso per comodità tali dati vengono mostrati in grafici a barre oppure a linee di punti dove non sempre è intuitivo, soprattutto per chi non ha dimestichezza con questa tecnica, capire cosa realmente è stato misurato e di conseguenza il significato dell'esperimento. Per tali ragioni ritengo utile innanzi tutto mostrare in Fig. 15 un esempio esplicativo di tale tecnica.

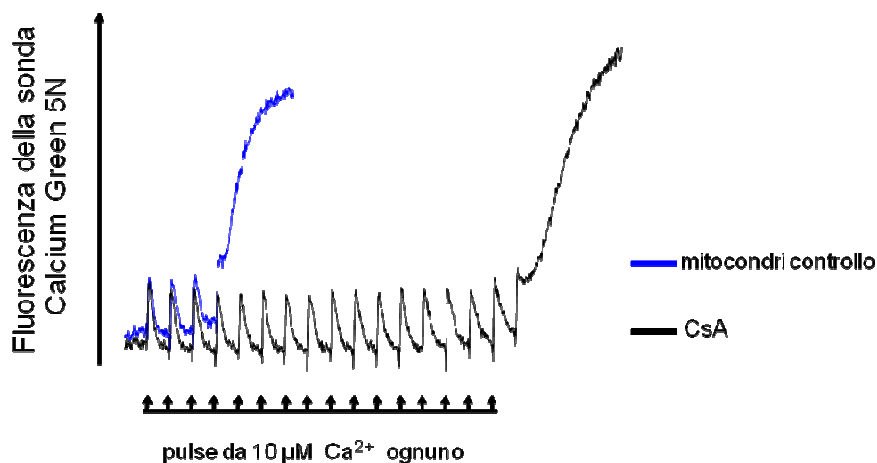


Fig. 15. **Esempio esplicativo della tecnica della CRC.** I mitocondri da fegato di topo sono stati isolati e saggiati per la CRC come descritto in Materiali e Metodi. La *traccia blu* si riferisce alla CRC della sospensione mitocondriale di controllo, la *traccia nera* si riferisce a mitocondri trattati con CsA 0.8  $\mu\text{M}$ .

Il protocollo della CRC consiste nell'incubare i mitocondri energizzati con la sonda fluorescente Calcium Green 5N per seguire l'andamento del  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondriale. Ad intervalli regolari di tempo (1 minuto) vengono effettuate delle aggiunte di  $\text{Ca}^{2+}$  (in genere 10  $\mu\text{M}$ ), il quale viene accumulato nei mitocondri fino al raggiungimento della soglia che causa l'apertura del PTP, depolarizzazione mitocondriale e quindi rapido rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$  precedentemente accumulato (Fig. 15, traccia blu). L'aggiunta di un inibitore del poro nella fase di incubazione (come la CsA nell'esempio in questione), causa una desensibilizzazione del PTP al  $\text{Ca}^{2+}$ , con conseguente spostamento della soglia di apertura a livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  più alti (Fig. 15, traccia nera).

Tale tecnica, ci permette quindi di verificare gli eventuali effetti inibitori (o induttori) che un determinato composto può avere sul PTP. Come appena visto infatti, se in condizioni basali i mitocondri riescono ad accumulare una certa quantità di  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CRC}_0$ ), in presenza di un inibitore del poro tale quantità sarà maggiore (o minore nel caso di induttori), e sarà tanto maggiore (o minore) quanto più potente è il composto ( $\text{CRC}_i$ ). Quindi, il rapporto  $\text{CRC}_i/\text{CRC}_0$  ci dà un'idea dell'attività di un composto sul PTP, in quanto, se il rapporto è maggiore di 1 significa che siamo in presenza di un inibitore, e tale rapporto sarà tanto maggiore di 1 quanto più grandi sono le proprietà

inibitorie del composto. Viceversa, in presenza di un induttore sarà minore di 1, e sarà tanto minore quanto maggiore è l'effetto di induzione sul PTP. Da come si può vedere in Fig. 16 (pannello A), il composto CngPtP003 si comporta come un inibitore del poro, con un massimo di attività alla concentrazione di 1  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}=0.22 \mu\text{M}$ ) alla quale il rapporto  $\text{CRC}_i/\text{CRC}_0$  viene praticamente raddoppiato.

E' importante verificare se alle concentrazioni utili efficaci, non siano presenti effetti tossici sui mitocondri. Per questo motivo il composto è stato testato sulla respirazione mitocondriale, misurata attraverso il consumo di ossigeno di una sospensione di mitocondri secondo la procedura descritta nei Materiali e Metodi. Nella Fig. 16 (pannello B), si può notare come fino a 5  $\mu\text{M}$  il composto non presenti effetti apprezzabili nè sulla respirazione basale (*quadrati*), nè su quella stimolata da ADP (*triangoli*) nè sulla respirazione massima ottenuta in presenza del disaccoppiante dinitrofenolo (DNF) (*cerchi*). Questi dati ottenuti sulla respirazione sono molto importanti in quanto ci informano che abbiamo un certo margine di sicurezza nell'uso di questo composto, in quanto nell'immediato intorno di 1  $\mu\text{M}$  che rappresenta la concentrazione a cui il CngPtP003 ha la sua massima attività di inibizione, non si hanno effetti tossici sui mitocondri. A concentrazioni superiori il principale effetto osservabile è una riduzione progressiva della respirazione massima ma senza effetti disaccoppianti (che si evidenzerebbero con un aumento della respirazione basale).

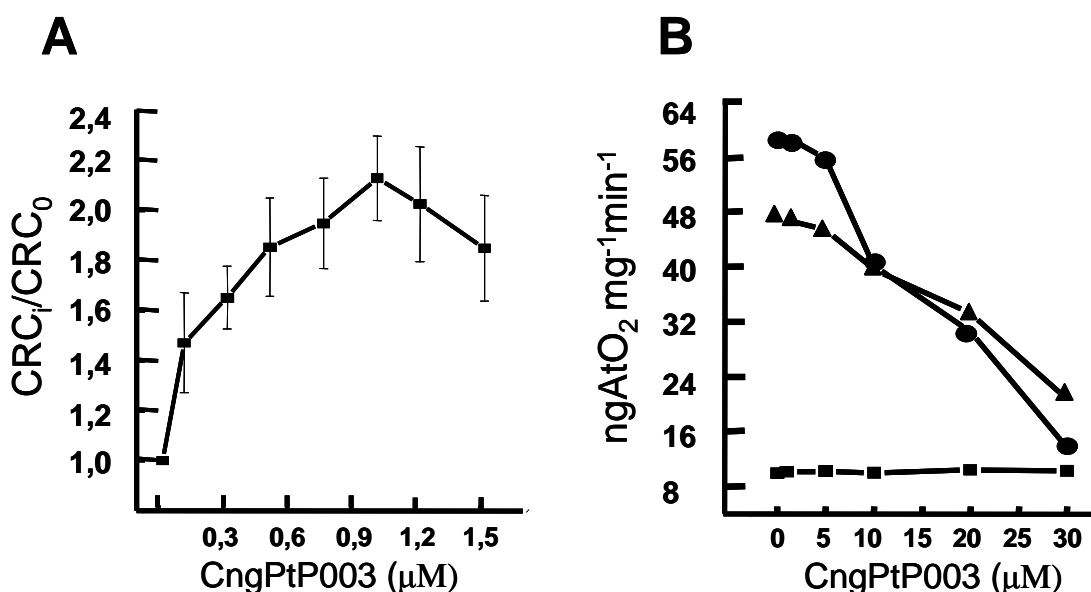


Fig. 16. **Caratterizzazione degli effetti mitocondriali di CngPtP003.** I mitocondri di fegato sono stati isolati secondo il protocollo descritto nei Materiali e Metodi. Pannello A: andamento del rapporto  $CRC_i/CRC_0$  in funzione della concentrazione di CngPtP003. La figura rappresenta la media di tre singoli esperimenti. Pannello B: misura del consumo di ossigeno dei mitocondri in presenza delle concentrazioni indicate di CngPtP003. Il consumo di  $O_2$  è stato misurato sia in condizioni basali (*quadrati*), sia stimolando la respirazione con ADP (*triangoli*), sia stimolandola al massimo con DNF (*cerchi*).

### 5.1.2. Caratterizzazione degli effetti mitocondriali di CngPtP006

Anche per questo composto sono stati eseguiti gli stessi esperimenti che per il composto precedente e i risultati sono riportati in Fig. 17.

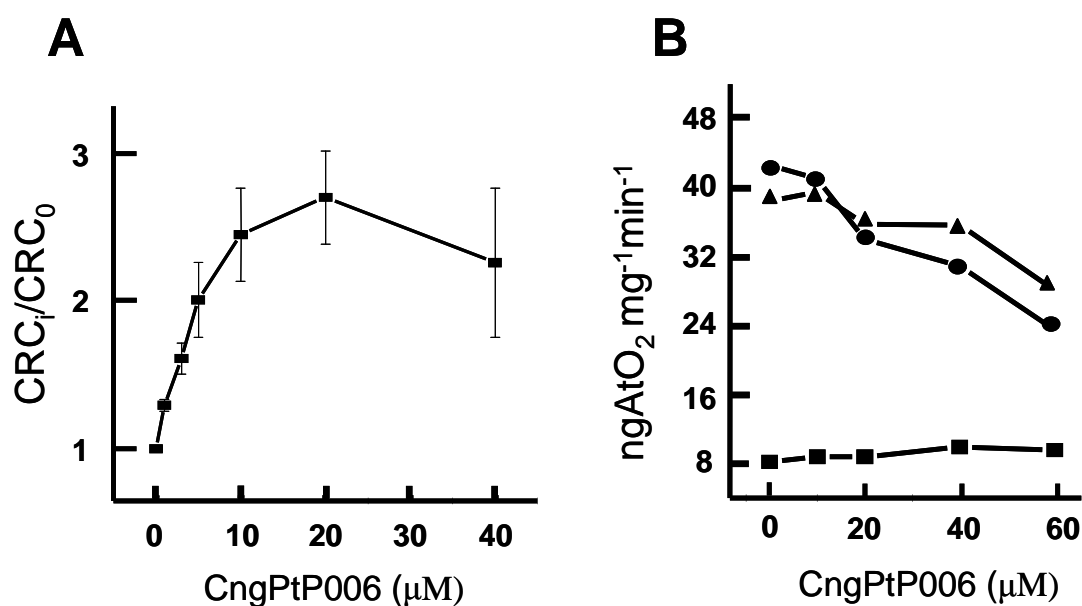


Fig. 17. **Caratterizzazione degli effetti mitocondriali di CngPtP006.** I mitocondri di fegato sono stati isolati secondo il protocollo descritto nei Materiali e Metodi. Pannello A: andamento del rapporto  $CRC_i/CRC_0$  in funzione della concentrazione di CngPtP006. La figura rappresenta la media di tre singoli esperimenti. Pannello B: misura del consumo di ossigeno dei mitocondri in presenza delle concentrazioni indicate di CngPtP006. Il consumo di  $O_2$  è stato misurato sia in condizioni basali (*quadrati*), sia stimolando la respirazione con ADP (*triangoli*), sia stimolandola al massimo con DNF (*cerchi*).

Come si può vedere nel pannello A, questo composto presenta un massimo di inibizione a 20  $\mu M$  ( $IC_{50} = 4.35 \mu M$ ) alla quale il rapporto  $CRC_i/CRC_0$  viene quasi triplicato. Dal pannello B, è invece possibile vedere

come anche in questo caso non siano presenti effetti apprezzabili sulla respirazione nell'intervallo di concentrazioni utili efficaci.

Da questa prima serie di esperimenti possiamo quindi concludere che entrambi i composti si comportano come inibitori del PTP senza mostrare particolari effetti tossici a livello mitocondriale. Il CngPtP003 ha un  $IC_{50}$  circa 20 volte minore rispetto al CngPtP006 ed è quindi più potente rispetto a quest'ultimo, tuttavia il CngPtP006 mostra una maggiore efficacia in quanto il rapporto  $CRC_i/CRC_0$  è più alto rispetto al CngPtP003.

## ***5.2 Relazione con gli effetti inibitori della CsA***

Il passo successivo è stato quello di andare a confrontare gli effetti inibitori dei composti con quelli della CsA che, essendo un classico e ben caratterizzato inibitore del PTP, nel corso di questo lavoro di tesi rappresenterà il metro di paragone con cui confrontare l'azione dei nostri composti. Questi esperimenti hanno un duplice scopo: da un lato infatti vogliamo paragonare la potenza e l'efficacia dei nostri inibitori con quelli della CsA per avere un'idea del loro possibile effetto biologico, dall'altro, essendo ben noto il sito d'azione della CsA, vogliamo studiare se si legano o meno allo stesso bersaglio. Disponendo infatti di inibitori con un target diverso, si può pensare di marcarli radioattivamente e, attraverso esperimenti di binding, risalire al loro sito d'azione, consentendo così un importante passo in avanti nell'identificazione dei suoi componenti molecolari. Un'altra prospettiva interessante che si aprirebbe in caso di target d'azione diverso è rappresentata dal probabile effetto additivo che potrebbe portare ad un efficace uso combinatorio in modelli animali di malattia in cui è coinvolto il PTP.

### ***5.2.1 CngPtP003 e CsA***

Per poter paragonare gli effetti biologici di CngPtP003 con quelli della CsA abbiamo rapportato i valori di CRC ottenuti in presenza di CngPtP003 alle concentrazioni indicate, con il valore di CRC ottenuto in presenza di CsA

0.8  $\mu\text{M}$  (alla quale si ha il massimo di inibizione sulla CRC) e i valori sono stati espressi in percentuale. Dalla Fig. 18 pannello A si evince come questo composto arrivi a circa il 60 % di inibizione rispetto alla CsA

Come già accennato, ancora più interessante è andare a vedere se l'effetto inibitorio di CngPtP003 è additivo con quello della CsA. E' importante tener presente che con due inibitori presenti contemporaneamente non si sommeranno solo gli effetti inibitori, ma anche quelli tossici, il che potrebbe portare ad una diminuzione della CRC. Per questo motivo abbiamo deciso di eseguire l'esperimento in presenza di CsA alla sua massima concentrazione di inibizione, 0.8  $\mu\text{M}$ , in quanto sappiamo già che non dà problemi di tossicità, e di una concentrazione di "sicurezza", a cui si abbia circa l'80 % di inibizione per quanto riguarda i nostri composti. In Fig. 18 pannello B è riportato l'esperimento con il composto CngPtP003, nel quale abbiamo confrontato i mitocondri controllo in cui per definizione il rapporto  $\text{CRC}_i/\text{CRC}_0$  è pari a uno (barra 1), l'inibizione che si ottiene in presenza di CngPtP003 0.5  $\mu\text{M}$  (barra 2), in presenza di CsA 0.8  $\mu\text{M}$  (barra 3) ed in presenza di entrambi gli inibitori, CsA e CngPtP003, rispettivamente a 0.8  $\mu\text{M}$  e 0.5  $\mu\text{M}$  (barra 4). Come si può vedere, in presenza di entrambi gli inibitori si ottiene un rapporto  $\text{CRC}_i/\text{CRC}_0$  maggiore di quello che si ottiene in presenza di uno solo dei due inibitori. Possiamo quindi concludere che i gli effetti inibitori di CngPtP003 e CsA sono additivi in quanto i due composti probabilmente vanno ad agire in siti diversi.

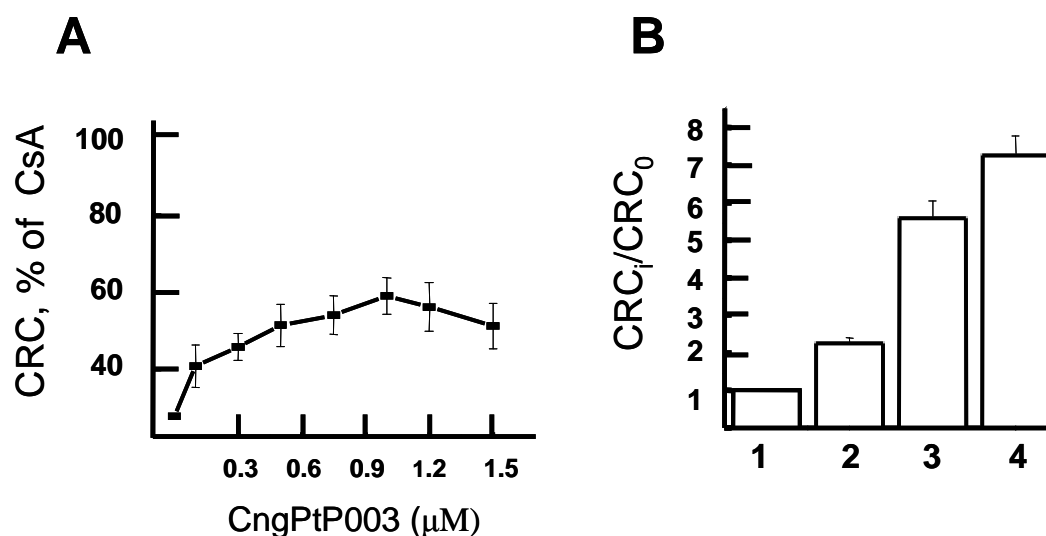




Fig. 18. **CngPtP003 e CsA.** I mitocondri di fegato sono stati isolati secondo il protocollo descritto nei Materiali e Metodi. Pannello A: i valori di  $CRC_i/CRC_0$  ottenuti per il composto CngPtP003 alle concentrazioni indicate (riportati nella Fig. 15 pannello A) sono stati rapportati al valore di  $CRC_i/CRC_0$  ottenuto per la CsA 0.8  $\mu\text{M}$  ed il risultato ottenuto espresso in percentuale. Pannello B: rapporto  $CRC_i/CRC_0$  di una sospensione mitocondriale controllo (barra 1), di una sospensione mitocondriale trattata con CngPtP003 0.5  $\mu\text{M}$  (barra 2), con CsA 0.8  $\mu\text{M}$  (barra 3), o con CngPtP003 0.5  $\mu\text{M}$  + CsA 0.8  $\mu\text{M}$  (barra 4). In figura, per entrambi i pannelli, sono riportate le medie di tre singoli esperimenti.

### 5.2.2 CngPtP006 e CsA

Gli stessi esperimenti eseguiti per CngPtP003 sono stati ripetuti anche per CngPtP006. In Fig. 19 pannello A si può vedere come questo composto raggiunga circa il 90 % dell'effetto inibitorio della CsA confermando la maggior efficacia rispetto a CngPtP003. Nel pannello B della medesima figura si può invece vedere come in presenza dei due inibitori assieme, CsA 0.8  $\mu\text{M}$  e CngPtP006 10  $\mu\text{M}$  (concentrazione che per questo composto fornisce circa l'80 % dell'inibizione, barra 4), si abbia un rapporto  $CRC_i/CRC_0$  maggiore rispetto ai due singoli inibitori (barra 3 per la CsA e barra 2 per CngPtP006), e ovviamente anche rispetto ai mitocondri controllo (barra 1).

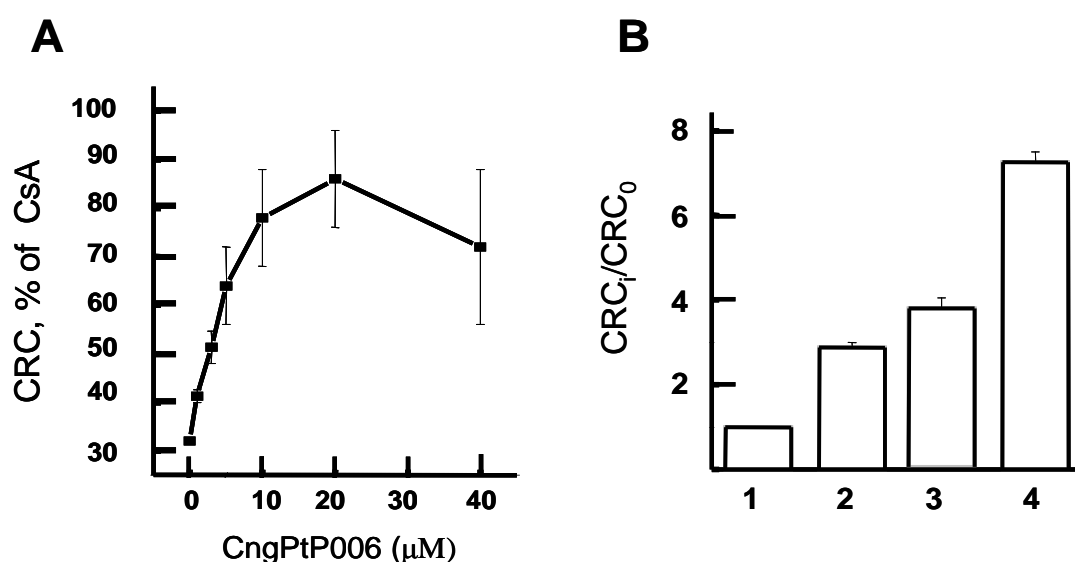


Fig. 19. **CngPtP006 e CsA.** I mitocondri di fegato sono stati isolati secondo il protocollo descritto nei Materiali e Metodi. Pannello A: i valori di  $CRC_i/CRC_0$  ottenuti per il composto CngPtP006 alle concentrazioni indicate (riportati nella Fig. 15 pannello A) sono stati

rapportati al valore di  $CRC_i/CRC_0$  ottenuto per la CsA 0.8  $\mu$ M ed il risultato ottenuto espresso in percentuale. Pannello B: rapporto  $CRC_i/CRC_0$  di una sospensione mitocondriale controllo (barra 1), di una sospensione mitocondriale trattata con CngPtP006 10  $\mu$ M (barra 2), con CsA 0.8  $\mu$ M (barra 3), o con CngPtP006 10  $\mu$ M + CsA 0.8  $\mu$ M (barra 4). In figura, per entrambi i pannelli, sono riportate le medie di tre singoli esperimenti.

A questo punto abbiamo quindi un'idea della potenza biologica degli inibitori relativa a quella della CsA. Il CngPtP006 pur essendo 25 volte meno potente di quest'ultima riesce a raggiungere circa il suo stesso livello di inibizione. Il CngPtP003 ha una potenza biologica molto simile alla CsA ma arriva a circa il 60 % del suo livello di inibizione.

Abbiamo quindi stabilito che probabilmente entrambi i nostri inibitori hanno come bersaglio un sito del PTP diverso dalla CyP-D che è il sito a cui si lega la CsA.

### **5.3 Determinazione della resistenza al lavaggio**

Come accennato in precedenza, una importante applicazione dei composti è rappresentata dalla possibilità di utilizzarli in esperimenti *in vivo* nei modelli animali di malattia in cui è coinvolto il PTP. In questo tipo di esperimenti è però necessario che il composto in esame abbia un legame stabile con il suo bersaglio. Per determinare se il legame dei nostri inibitori al loro sito bersaglio sia sufficientemente stabile da permetterne l'uso in esperimenti *in vivo*, abbiamo deciso di eseguire prove di lavaggio sui mitocondri isolati trattati, o meno, con i composti. La procedura è descritta nei Materiali e Metodi e consiste nel sottoporre i mitocondri isolati pretrattati con i composti o con solo solvente a cicli di centrifugazione e risospensione e quindi misurarne la CRC. Se i mitocondri pretrattati con gli inibitori danno una CRC più alta rispetto ai mitocondri controllo significa che il legame degli inibitori con il loro bersaglio è di tipo covalente o comunque sufficientemente stabile da resistere ai processi di lavaggio. Il risultato dell'esperimento è riportato in Fig. 20. Nel pannello A sono riportati i dati relativi al composto CngPtP003, mentre nel pannello B quelli relativi a CngPtP006: si nota subito come entrambi i composti siano resistenti ai processi di lavaggio in quanto i

mitocondri pretrattati con CngPt003 1 $\mu$ M o CngPtP006 20  $\mu$ M e successivamente sottoposti a lavaggio (barra 2 per entrambi i pannelli) danno una CRC piú alta dei mitocondri pretrattati con il solo solvente DMSO e sottoposti allo stesso processo di lavaggio (barra 1 per entrambi i pannelli).

È stata anche misurata la CRC dei mitocondri lavati e quindi trattati con CngPtP003 1  $\mu$ M o CngPtP006 20  $\mu$ M (barra 3 per entrambi i pannelli) per farci un'idea della resistenza dei composti al processo di lavaggio. Infatti, se l'aggiunta di inibitore in cuvetta desse una CRC piú alta rispetto a quella che si ottiene con il composto aggiunto prima del lavaggio allora una frazione dell'inibitore si sarebbe dissociata dal proprio bersaglio durante i cicli di centrifugazione-risospensione. Come si può vedere, (Fig. 20), per entrambi i composti, la CRC che si ottiene con l'inibitore aggiunto dopo il processo di lavaggio è invece minore. Probabilmente questo è dovuto alla perdita di fattori di regolazione del PTP , per esempio la deplezione di Mg<sup>2+</sup> e ATP che si verifica durante i cicli di centrifugazione-risospensione.

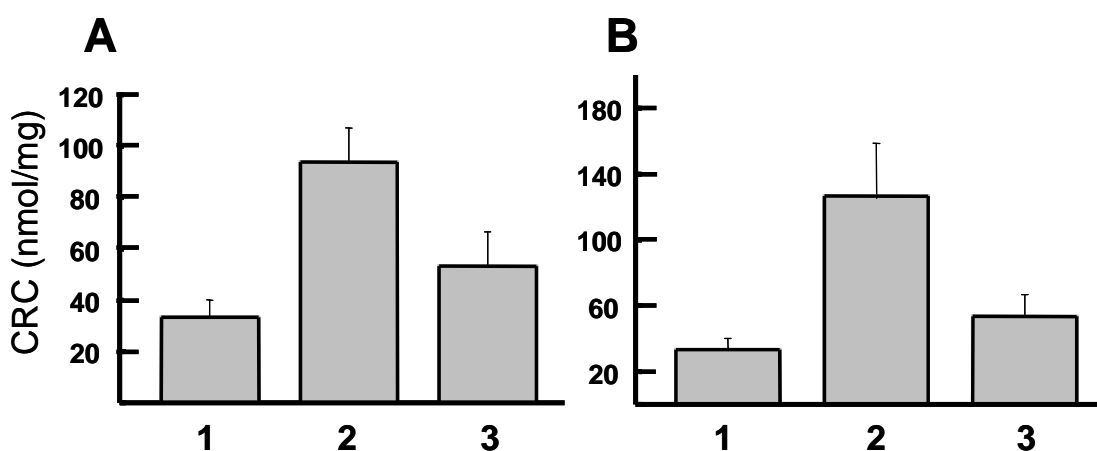


Fig. 20. **Misurazione della resistenza al washing-out di CngPtP003 (pannello A) e CngPtP006 (pannello B).** Pannello A: valori di CRC espressi in nmol di Ca<sup>2+</sup> per mg di proteina di una sospensione mitocondriale controllo sottoposta a processo di washing-out (barra 1), di una sospensione pretrattata con CngPtP003 1 $\mu$ M e sottoposta allo stesso trattamento (barra 2), e di una sospensione sottoposta a washing-out e successivamente trattata con CngPtP003 1 $\mu$ M (barra 3). Pannello B: valori di CRC espressi in nmol di Ca<sup>2+</sup> per mg di proteina di una sospensione mitocondriale controllo sottoposta a processo di washing-out (barra 1), di una sospensione pretrattata con CngPtP006 20 $\mu$ M e sottoposta allo stesso trattamento (barra 2), e di una sospensione sottoposta a washing-out e successivamente trattata con CngPtP006 20 $\mu$ M (barra 3). Nelle figure sono riportate le medie di tre singoli esperimenti mentre la CRC è riportata in valore assoluto espresso in nmol di Ca<sup>2+</sup> per mg di proteina.

Possiamo quindi concludere da questa serie di esperimenti che entrambi i composti si legano al loro bersaglio mitocondriale con un legame probabilmente di tipo covalente, sufficientemente stabile da resistere a processi di lavaggio e da permetterne l'uso in studi *in vivo*.

## **5.4 Studio dell'effetto degli inibitori in cellule intatte**

### **5.4.1 Attività sul potenziale di membrana mitocondriale**

Dopo aver caratterizzato l'azione degli inibitori sui mitocondri isolati da fegato di topo, il passo successivo è stato quello di studiarne l'effetto sulla funzione mitocondriale *in situ*, cioè in cellule intatte. Lo scopo finale di questi esperimenti è quello di capire se essi sono in grado di inibire il PTP anche a livello cellulare ed in particolare su linee cellulari umane (cellule HeLa) di carcinoma della cervice uterina. La speranza dello studio di questi inibitori è quella di poterli usare come possibili farmaci nella cura di patologie in cui sia coinvolto il PTP. In quest'ottica, il primo passo da fare è quello di verificare che i composti non abbiano effetti tossici di per sé sulla funzione mitocondriale a livello cellulare, e per questo abbiamo testato l'azione dei due inibitori sul potenziale di membrana mitocondriale con la tecnica della TMRM.

Come già accennato in Materiali e Metodi, la TMRM è una sonda fluorescente lipofilica e cationica che si accumula nella matrice mitocondriale in risposta al  $\Delta\Psi_m$  rendendo quindi fluorescenti i mitocondri alla visione al microscopio ad epifluorescenza. Qualsiasi evento che porti alla dissipazione del potenziale di membrana (come effetti tossici a livello della funzionalità mitocondriale) porterà a depolarizzazione con fuoriuscita della sonda e quindi a diminuzione di fluorescenza (vedi l'aggiunta di FCCP 200 nM in tutte le figure dove è studiato il potenziale di membrana).

In Fig. 21 è riportata l'azione dei due inibitori sul potenziale di membrana mitocondriale (pannello A per CngPtP003 e pannello B per

CngPtP006). Cellule HeLa sono state incubate con la TMRM come descritto nei Materiali e Metodi e trattate con i composti a diverse concentrazioni dopo due minuti dall'inizio dell'esperimento. Abbiamo testato i composti non solo alle concentrazioni nel range di quelle efficaci trovate per i mitocondri isolati, ma anche a dosi più alte in quanto, in generale, quando si passa da mitocondri isolati a cellula possono essere necessarie concentrazioni maggiori per avere lo stesso effetto. Come si può vedere dalla Fig. 21 il composto CngPtP003 alle concentrazioni rispettivamente di 0.5  $\mu\text{M}$  (traccia rossa); 3  $\mu\text{M}$  (traccia blu) e 30  $\mu\text{M}$  (traccia verde) non mostra alcun effetto sul potenziale di membrana mitocondriale.

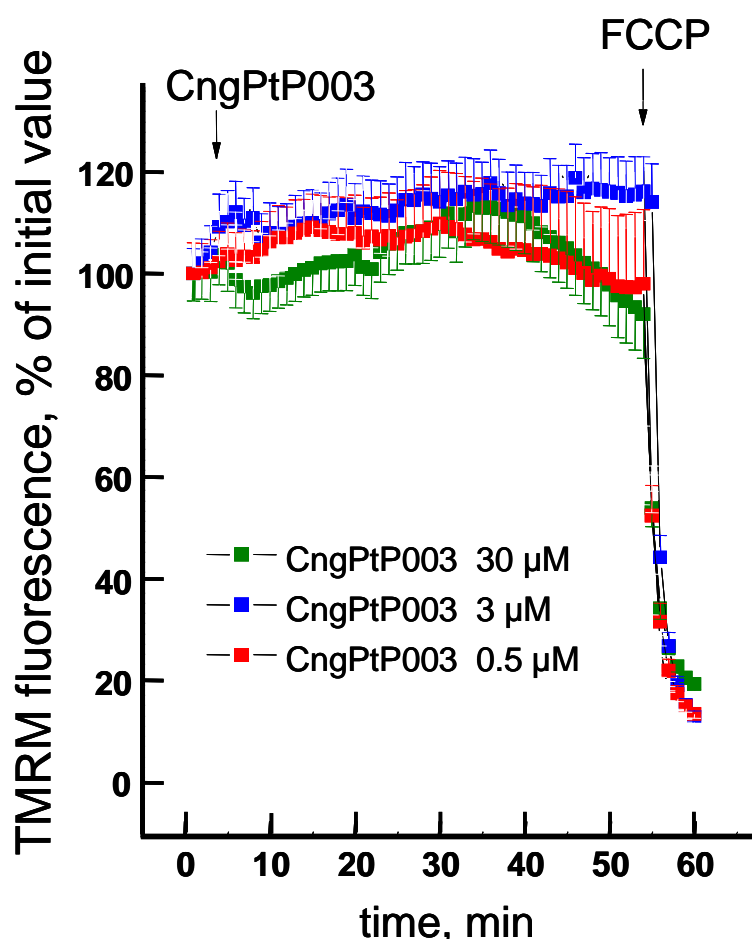


Fig. 21. **Effetto di CngPtP003 sul potenziale di membrana mitocondriale.** Cellule HeLa sono state caricate come descritto in Materiali e Metodi. Le immagini di fluorescenza sono state acquisite ogni minuto al microscopio ad epifluorescenza. Dove indicato (*freccie*) sono stati aggiunti CngPtP003 e FCCP 200 nM. Cellule trattate con CngPtP003 0.5  $\mu\text{M}$  (traccia blu), CngPtP003 3  $\mu\text{M}$  (traccia rossa) o CngPtP003 30  $\mu\text{M}$  (traccia verde). In figura è riportata la media di tre singoli esperimenti.

Anche il composto CngPtP006 (Fig. 22), alle concentrazioni rispettivamente di 10  $\mu\text{M}$  (traccia rossa), 20  $\mu\text{M}$  (traccia verde) e 50  $\mu\text{M}$  (traccia blu), non mostra effetti depolarizzanti sui mitocondri.

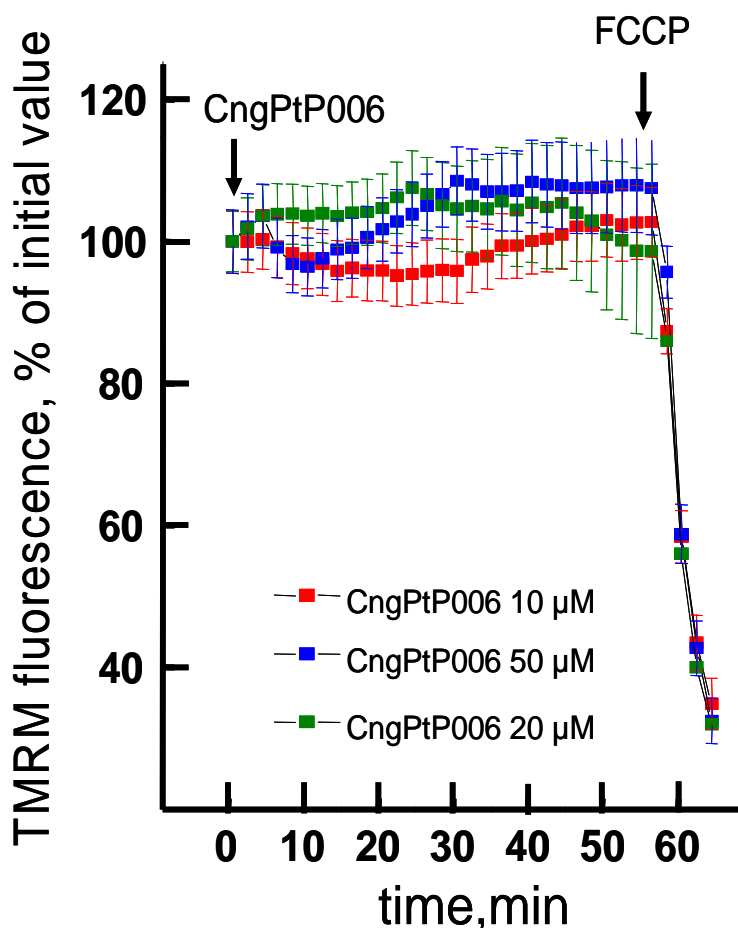


Fig. 22. **Effetto di CngPtP006 sul potenziale di membrana mitocondriale.** Cellule HeLa sono state caricate come descritto in Materiali e Metodi. Le immagini di fluorescenza sono state acquisite ogni 2 minuti al microscopio ad epifluorescenza. Dove indicato (*freccie*) sono stati aggiunti CngPtP006 e FCCP 200 nM. Cellule trattate con CngPtP006 50  $\mu\text{M}$  (traccia blu), CngPtP006 10  $\mu\text{M}$  (traccia rossa) o CngPtP006 20  $\mu\text{M}$  (traccia verde). In figura è riportata la media di tre singoli esperimenti.

Si può pertanto concludere che questi due composti, alle concentrazioni oggetto di studio non compromettono la funzionalità mitocondriale di cellule HeLa in quanto non provocano alcuna depolarizzazione del potenziale di membrana.

### 5.4.2 Protezione dalla depolarizzazione indotta da Acido Arachidonico

Una volta stabilito che i nostri inibitori non danno tossicità mitocondriale acuta a livello cellulare, il passo successivo è stato quello di valutare se siano in grado di proteggere le cellule dalla depolarizzazione provocata da apertura del PTP. L'acido arachidonico (ARA) o acido 5,8,11,14 eicosatetraenoico, è una molecola con numerosi ed importanti effetti biologici (vedi Brash, 2001 per una review). L'ARA è inoltre un potente induttore del PTP sia in mitocondri isolati che in cellule intatte, dove causa una immediata e completa depolarizzazione mitocondriale inibita dalla CsA (Scorrano *et al.*, 2001). Abbiamo quindi valutato se i nostri composti potessero fornire la stessa protezione. Le cellule sono state caricate con la TMRM come descritto nei Materiali e Metodi ed incubate con CsA 0.8  $\mu\text{M}$  (*cerchi vuoti*), con CngPtP006 20  $\mu\text{M}$  (*quadrati vuoti*), con CngPtP003 1  $\mu\text{M}$  (*quadrati pieni*) o con solo CsH 1.6  $\mu\text{M}$  (*cerchi pieni*) e trattate con ARA 30  $\mu\text{M}$  due minuti dopo l'inizio dell'esperimento (Fig. 22).

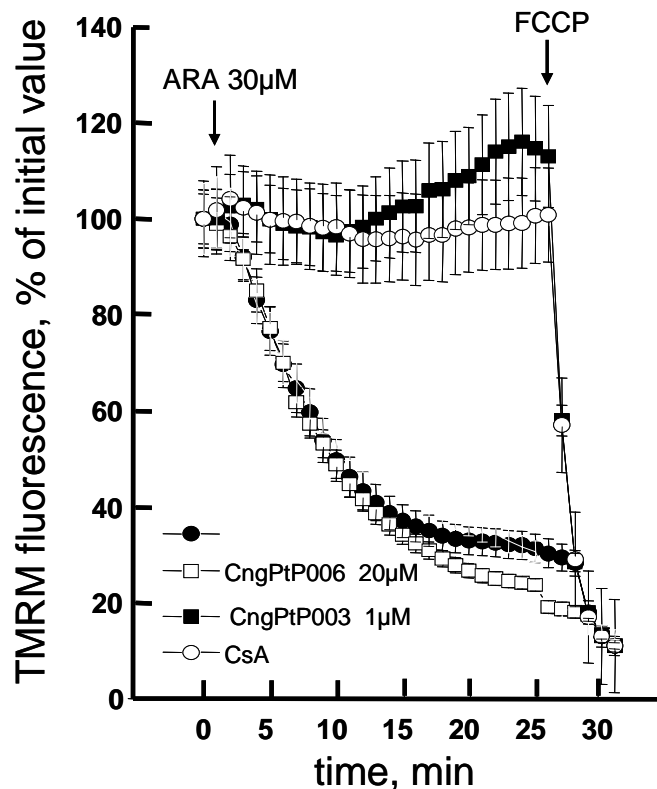


Fig. 23. **Effetto di CngPtP003 e CngPtP006 sulla depolarizzazione indotta da ARA.** Cellule HeLa sono state caricate come descritto in Materiali e Metodi. Le immagini di fluorescenza sono state acquisite ogni minuto al microscopio ad epifluorescenza. Dove indicato (*frecche*) sono stati aggiunti ARA 30  $\mu\text{M}$  e FCCP 200 nM. I *cerchi vuoti* si riferiscono a cellule incubate per 30 minuti con CsA 0.8  $\mu\text{M}$ , i *quadrati pieni* a cellule incubate con CngPtP003 1  $\mu\text{M}$ , i *quadrati vuoti* a cellule incubate con CngPtP006 20  $\mu\text{M}$  mentre i *cerchi pieni* si riferiscono a cellule incubate con sola CsH 1.6  $\mu\text{M}$  (presente anche in tutte le altre condizioni ad eccezione delle cellule incubate con CsA).

Come si può vedere dalla Fig. 23, l'acido arachidonico causa una veloce depolarizzazione mitocondriale completamente inibita dalla CsA (a riprova che la depolarizzazione è PTP-dipendente) e da CngPtP003, ma non da CngPtP006. Inoltre, come si può vedere in Fig. 24, la protezione conferita da CngPtP003 ha un andamento dose-dipendente con una completa protezione a 1  $\mu\text{M}$  (*triangoli pieni*), paragonabile a quella della CsA (*cerchi vuoti*), che diventa intermedia al dimezzarsi della concentrazione (*cerchi pieni*).

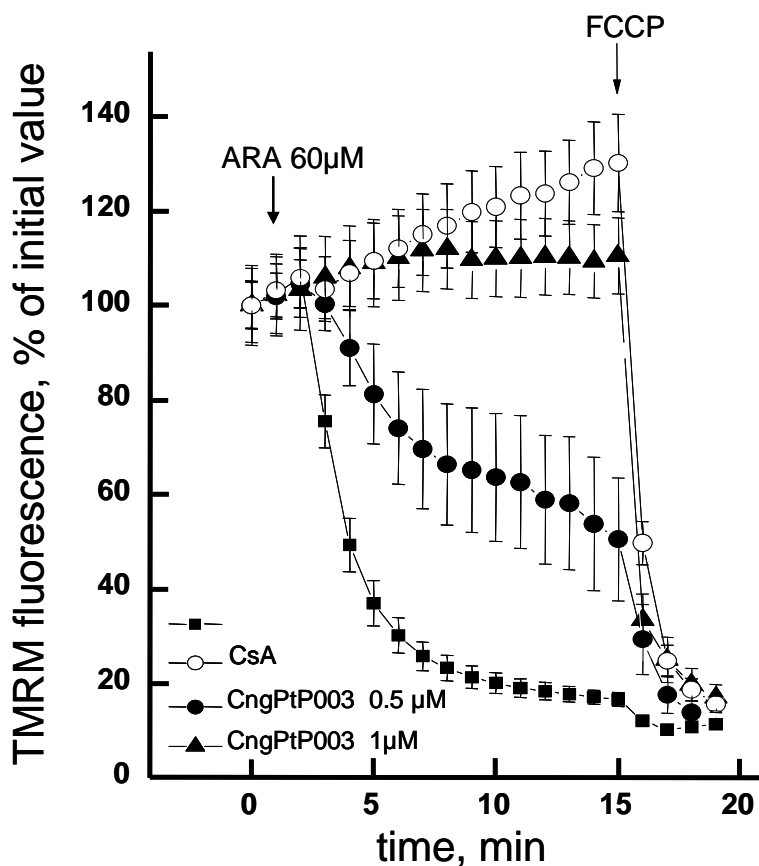




Fig. 24. **Dose dipendenza dell'azione di CngPtP003 sulla protezione da ARA.** Cellule HeLa sono state caricate come descritto in Materiali e Metodi. Le immagini di fluorescenza sono state acquisite ogni minuto al microscopio ad epifluorescenza. Dove indicato (*frecce*) sono stati aggiunti ARA 60  $\mu\text{M}$  e FCCP 200 nM. I *cerchi vuoti* si riferiscono a cellule incubate per 30 minuti con CsA 0.8  $\mu\text{M}$ , i *triangoli pieni* a cellule incubate con CngPtP003 1  $\mu\text{M}$ , i *cerchi pieni* a cellule incubate con CngPtP003 0.5  $\mu\text{M}$  mentre i *quadrati pieni* si riferiscono a cellule incubate con sola CsH 1.6  $\mu\text{M}$  (presente anche in tutte le altre condizioni ad eccezione delle cellule incubate con CsA).

Da questa serie di esperimenti si evince quindi che mentre il CngPtP003 anche in linee cellulari umane mantiene le sue proprietà di inibitore del PTP nello stesso range di concentrazioni individuate nei mitocondri isolati da fegato di topo, il CngPtP006 risulta essere inattivo almeno in cellule HeLa e per quanto riguarda la protezione da ARA. Ci sono almeno due possibilità che possono spiegare questa mancanza di attività: la prima è che CngPtP006 una volta aggiunto alle cellule non riesca ad essere accessibile ai mitocondri, in quanto o non riesce a superare la membrana plasmatica o viene in qualche modo "inattivato" dall'ambiente cellulare (sequestro da parte di altri organelli, inattivazione enzimatica ecc.); la seconda ipotesi è che i mitocondri di fegato di topo e i mitocondri di cellule HeLa presentino differenze nella modulazione del PTP, vista la concreta possibilità di effetti specie-specifici nella regolazione del poro (Ricchelli *et al.*; 2005; Zulian *et al.*; 2007). Abbiamo quindi deciso, per individuare il perché della perdita di attività di questo composto nel passaggio da mitocondri isolati di topo a cellula umana, di compiere una sorta di passo indietro e di andare a studiare l'effetto di entrambi gli inibitori in mitocondri isolati da cellule HeLa, ed in varie linee cellulari umane previa permeabilizzazione della membrana plasmatica di quest'ultime con il detergente digitonina.

## **5.5 Studio dell'effetto degli inibitori in cellule HeLa permeabilizzate**

Grazie ad un protocollo messo appunto dal nostro laboratorio, siamo riusciti ad eseguire il saggio della CRC in cellule rese permeabili con il detergente digitonina, un detergente non ionico in grado di solubilizzare in modo piuttosto selettivo membrane contenenti colesterolo, che è più concentrato nella membrana plasmatica. L'azione della digitonina tende quindi a permeabilizzare soprattutto quest'ultima. Abbiamo quindi trattato le cellule HeLa con digitonina come descritto nei Materiali e Metodi, e abbiamo quindi valutato l'efficacia dei nostri composti con la tecnica della CRC. Per CngPtP003 il risultato dell'esperimento è riportato in Fig. 25: la traccia blu rappresenta la CRC della sospensione cellulare controllo mentre quella nera è la CRC che si osserva in presenza di CsA 0.8  $\mu\text{M}$ . Le tracce verde, rossa e fucsia rappresentano invece la CRC che si ottengono rispettivamente in presenza di 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$  di CngPtP003. Si può notare che CngPtP003 si comporta come inibitore del PTP anche in cellule permeabilizzate, in quanto è in grado di spostare la soglia per l'apertura del poro a valori di  $\text{Ca}^{2+}$  più alti rispetto alle cellule non trattate. È da notare inoltre, come i rapporti di attività tra il nostro inibitore e la CsA siano gli stessi di quelli riscontrati in mitocondri di topo, dato che CngPtP003 a 1  $\mu\text{M}$  (che anche in questo caso è quella a cui si ha la massima attività tra le concentrazioni testate) raggiunge circa il 60 % dell'inibizione ottenuta con CsA.

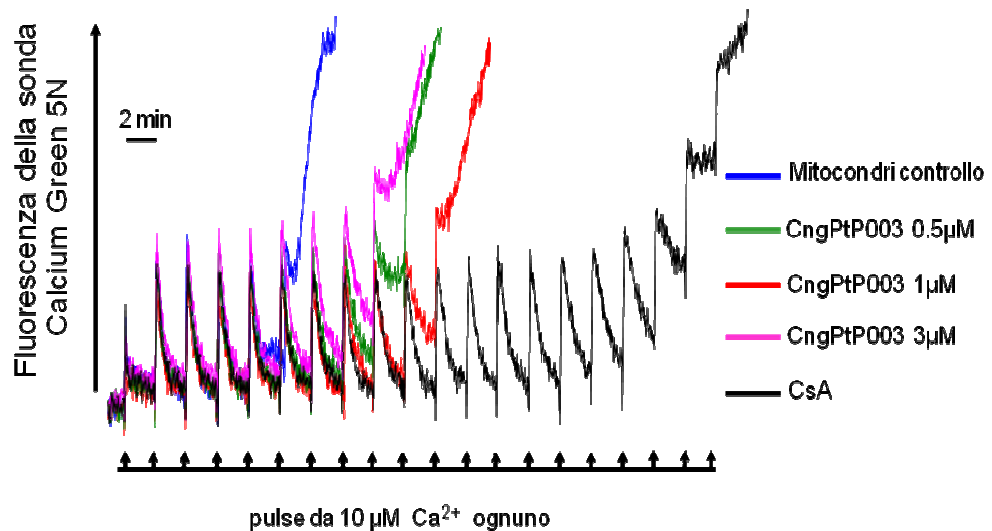


Fig. 25. **Attività di CngPtP003 sulla CRC di cellule HeLa permeabilizzate.** Cellule HeLa sono state permeabilizzate e saggate per la CRC come descritto in Materiali e Metodi. La *traccia blu* si riferisce alla CRC di cellule di controllo, la *traccia nera* si riferisce a cellule trattate con CsA 0.8  $\mu\text{M}$ , la *traccia verde* a cellule trattate con CngPtP003 0.5  $\mu\text{M}$ , la *traccia rossa* a cellule trattate con CngPtP003 1  $\mu\text{M}$  mentre la *traccia fucsia* a cellule trattate con CngPtP003 3  $\mu\text{M}$ .

Con la stessa tecnica abbiamo studiato anche il CngPtP006, ed il risultato dell'esperimento è riportato in Fig. 26. Ancora una volta la traccia blu rappresenta la CRC di una sospensione di cellule controllo mentre quella nera la CRC in presenza di CsA 0.8  $\mu\text{M}$ . Le tracce verde, fucsia e rossa rappresentano rispettivamente i valori di CRC in presenza di 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$  di CngPtP006. Come si può vedere, alle concentrazioni testate di CngPtP006 non si ha nessun effetto inibitorio sul PTP, la cui apertura in presenza del composto avviene agli stessi valori di  $\text{Ca}^{2+}$  della sospensione controllo.

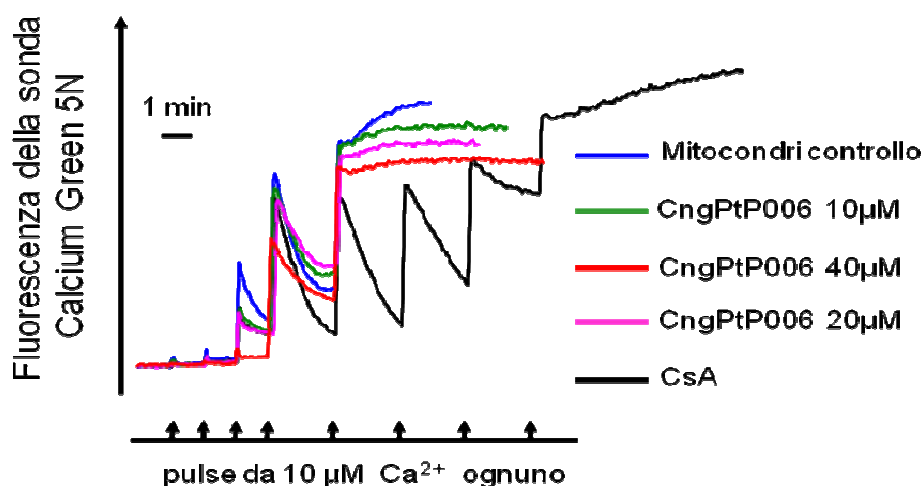


Fig. 26. **Attività di CngPtP006 sulla CRC di cellule HeLa permeabilizzate.** Cellule HeLa sono state permeabilizzate e saggiate per la CRC come descritto in Materiali e Metodi eccetto che i primi quattro pulse di  $\text{Ca}^{2+}$  sono stati fatti a intervalli di 1 minuto l'uno dall'altro. La *traccia blu* si riferisce alla CRC di cellule di controllo, la *traccia nera* si riferisce a cellule trattate con CsA 0.8  $\mu\text{M}$ , la *traccia verde* a cellule trattate con CngPtP006 10  $\mu\text{M}$ , la *traccia fucsia* a cellule trattate con CngPtP006 20  $\mu\text{M}$  mentre la *traccia rossa* a cellule trattate con CngPtP006 40  $\mu\text{M}$ .

Questi dati quindi confermano quelli ottenuti in cellule intatte; con il CngPtP003 che mantiene la propria attività inibitoria (attività peraltro paragonabile ai dati ottenuti nei mitocondri isolati da fegato di topo), e il CngPtP006 che si dimostra invece inattivo. Abbiamo però una importante informazione in più, in quanto possiamo escludere che questo composto perda la sua azione inibitoria sul PTP in quanto non permeabile alla membrana plasmatica. In presenza di digitonina infatti il composto può agevolmente raggiungere i mitocondri come precedentemente dimostrato dalla inibizione dell'uptake di  $\text{Ca}^{2+}$  rispetto ai controlli (Fig. 26). E' da rilevare il fatto che il mancato effetto inibitorio è stato confermato anche nelle linee cellulari umane Jurkat (linfociti T derivanti da linfoma umano) e RWPE 1 (cellule di epitelio prostatico). Se l'effetto di CngPtP006 è specie-specifico, e il composto non ha effetto sull'uomo, non ha senso continuarne lo sviluppo. Data l'importanza del problema abbiamo quindi deciso di studiarne gli effetti in mitocondri di cellule umane.

## 5.6 Studio dell'effetto degli inibitori in mitocondri isolati da cellule HeLa

Abbiamo isolato mitocondri da cellule HeLa come descritto in Materiali e Metodi e li abbiamo sottoposti alla misura della CRC in presenza o meno degli inibitori. Per quanto riguarda il composto CngPtP003 il risultato dell'esperimento è riportato in Fig. 27: la traccia blu rappresenta l'andamento della CRC di una sospensione mitocondriale controllo, mentre con la traccia nera è possibile seguire l'aumento di CRC che si ottiene in presenza di CsA 0.8  $\mu\text{M}$ . Le tracce fucsia, rossa e verde rappresentano i valori di CRC rispettivamente in presenza di 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$  di CngPtP003. Anche in mitocondri isolati da cellule umane il composto CngPtP003 si comporta quindi come un inibitore, con un comportamento molto simile a quello che si riscontra nelle cellule permeabilizzate e quindi in linea con i dati ottenuti in cellule intatte e nel topo.

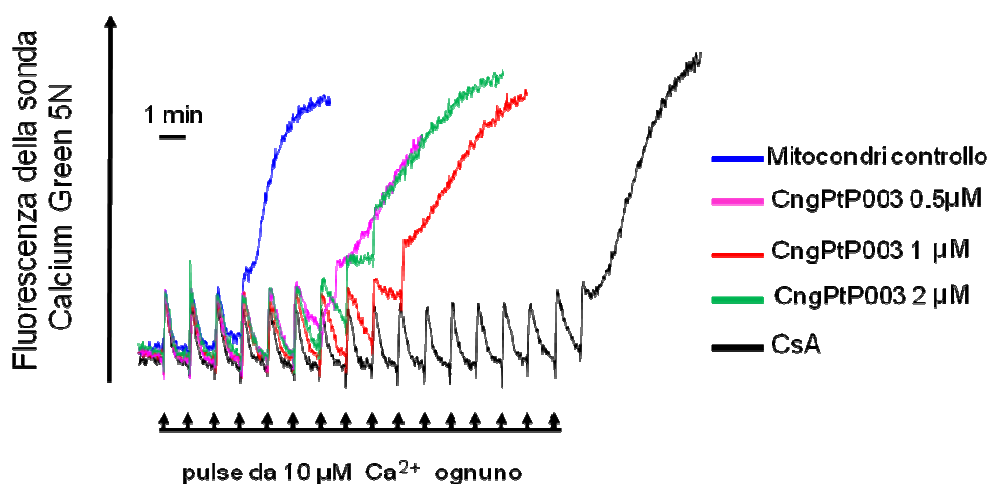


Fig. 27. **Attività di CngPtP003 sulla CRC di mitocondri isolati da cellule HeLa.** I mitocondri di HeLa sono stati isolati e saggati per la CRC come descritto in Materiali e Metodi. La *traccia blu* si riferisce alla CRC della sospensione mitocondriale di controllo, la *traccia nera* si riferisce a mitocondri trattati con CsA 0.8  $\mu\text{M}$ , la *traccia fucsia* a mitocondri trattati con CngPtP003 0.5  $\mu\text{M}$ , la *traccia rossa* a mitocondri trattati con CngPtP003 1  $\mu\text{M}$  mentre la *traccia verde* a mitocondri trattati con CngPtP003 2  $\mu\text{M}$ .

Abbiamo quindi studiato CngPtP006 ed il risultato dell'esperimento è riportato in Fig. 28. Anche qui, la traccia blu rappresenta la CRC di una sospensione mitocondriale controllo mentre quella nera la CRC in presenza di CsA 0.8  $\mu\text{M}$ . Le tracce fucsia, verde e rossa rappresentano i valori di CRC rispettivamente in presenza di 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  di CngPtP006. Da come si può vedere, non solo alle concentrazioni testate di CngPtP006 non si ha nessun effetto inibitorio sul PTP, ma sembra essere presente paradossalmente un certo effetto induttore in quanto l'apertura del poro avviene a concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  minori di quella richiesta ai mitocondri controllo.

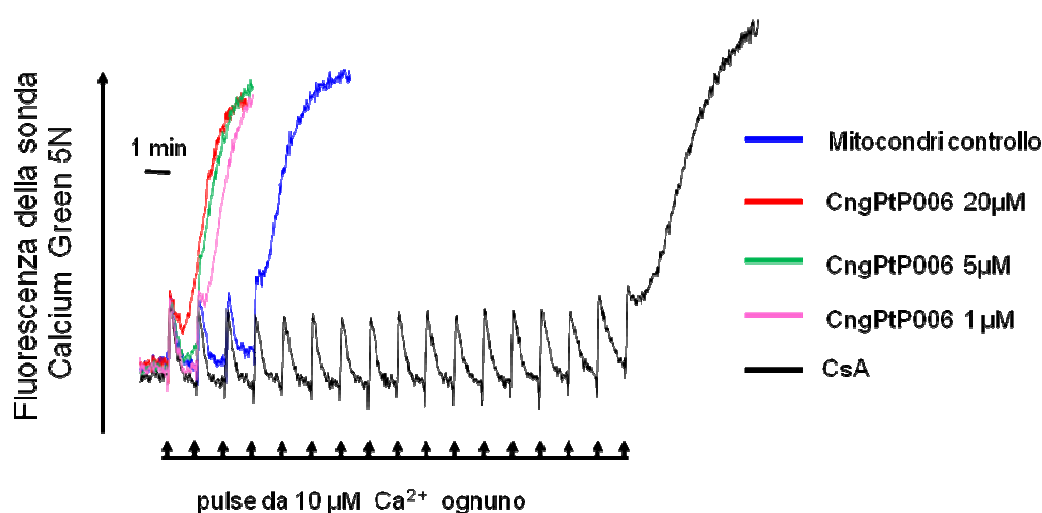


Fig. 28. **Attività di CngPtP006 sulla CRC di mitocondri isolati da cellule HeLa.** I mitocondri di HeLa sono stati isolati e saggati per la CRC come descritto in Materiali e Metodi. La *traccia blu* si riferisce alla CRC della sospensione mitocondriale di controllo, la *traccia nera* si riferisce a mitocondri trattati con CsA 0.8  $\mu\text{M}$ , la *traccia fucsia* a mitocondri trattati con CngPtP006 1  $\mu\text{M}$ , la *traccia verde* a mitocondri trattati con CngPtP006 5  $\mu\text{M}$  mentre la *traccia rossa* a mitocondri trattati con CngPtP006 20  $\mu\text{M}$ .

Possiamo quindi concludere che i dati che avevamo ottenuto in cellule intatte e nelle cellule permeabilizzate vengono confermati anche in mitocondri isolati dalle stesse cellule. Infatti, mentre l'effetto inibitorio di CngPtP003 rimane inalterato passando da cellule intatte, a cellule permeabilizzate e a mitocondri isolate dalle stesse, il CngPtP006 anche in questo caso perde ogni attività inibitoria sul PTP, dove sembra anzi essere

presente un effetto induttore paradossoso. Questi ultimi dati rendono remota l'ipotesi che in cellule umane il CngPtP006 venga inattivato rapidamente dall'ambiente intracellulare. La spiegazione più plausibile sembra dunque che l'inattività di CngPtP006 sia da imputare ad una differenza specie-specifica tra mitocondri umani e mitocondri di topo.

## **5.7 Studio dell'effetto di CngPtP003 sulla morte cellulare**

Abbiamo visto nell'introduzione come i mitocondri attraverso il PTP abbiano un ruolo fondamentale nei meccanismi che portano a morte cellulare. Il passo finale di questo lavoro di tesi è stato studiare se CngPtP003 è in grado di proteggere le cellule da stimoli di morte che dipendono dal PTP. In altre parole si tratta di capire se trattando le cellule con il composto esse sopravvivono all'induzione di morte dovuta a stimoli che provocano l'apertura del PTP. Il lavoro di Scorrano *et al.*, 2001, dimostra che l'ARA provoca morte cellulare PTP-dipendente; abbiamo perciò deciso di usare questo stimolo di morte per poi testarne la protezione con il nostro composto. Come controllo positivo ancora una volta è stata utilizzata la CsA. Le cellule sono quindi state incubate con CngPtP003 1  $\mu\text{M}$  o con CsA 4 $\mu\text{M}$  per 20 minuti, trattate con ARA 50  $\mu\text{M}$  per 90 minuti e marcate con Annessina-V e Sytox come descritto nei Materiali e Metodi. Nella Fig. 29 pannello A è riportata la percentuale di cellule morte (per semplicità viene riportato il numero totale di cellule marcate con i fluorofori indipendentemente dal fatto che si trattasse di apoptosi o di necrosi, ma a questi tempi di incubazione la morte è soprattutto con il fenotipo necrotico). Come si può notare il trattamento con ARA 50  $\mu\text{M}$  causa quasi il 100 % di morte cellulare (barra grigia della condizione controllo). Le cellule preincubate con CsA o con CngPtP003 mostrano invece una marcata riduzione della morte cellulare. In base a questi dati, possiamo quindi affermare che il composto CngPtP003 è in grado di aumentare la sopravvivenza delle cellule nei confronti dell' ARA.

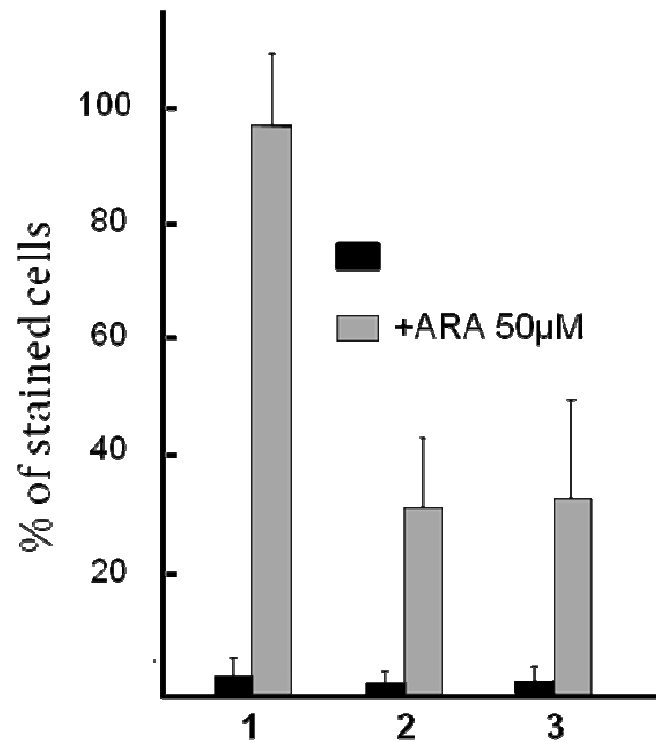
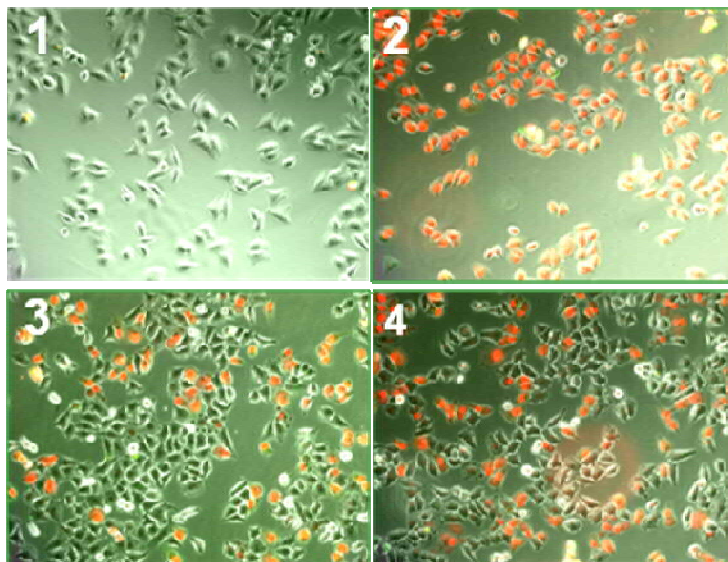
**A****B**

Fig. 29. **Attività di CngPtP003 sulla morte cellulare.** Pannello A: % di cellule morte (apoptosi e/o necrosi) di cellule controllo (1), di cellule preincubate con CsA 4 µM (2) o con CngPtP003 1 µM (3), rispettivamente in presenza (barra grigia) o in assenza (barra nera) di ARA 50 µM. Pannello B: rappresentazioni esemplificative dell'aspetto al microscopio ad epifluorescenza rispettivamente di un singolo campo di cellule non trattate ( riquadro 1), delle cellule trattate con ARA 50 µM (riquadro 2), delle cellule preincubate con CsA e successivamente trattate con ARA (riquadro 3) e delle cellule preincubate con CngPtP003 e successivamente trattate con ARA (riquadro 4).



## 6. CONCLUSIONI

E' ormai largamente dimostrato che i mitocondri, in particolare il PTP, hanno un ruolo centrale in molte condizioni patologiche. Tuttavia i meccanismi che portano a morte cellulare e che coinvolgono il PTP, così come la sua natura molecolare, sono ancora in gran parte oscuri. Questo è dovuto a numerosi fattori, come la complessità della modulazione del PTP ed il fatto che il verificarsi della transizione di permeabilità *in vivo* deve essere dedotta da dati indiretti, che spesso portano a problemi di interpretazione dei risultati sperimentali. Un altro problema è la mancanza di persistenza d'azione della CsA che può condurre a risultati negativi (mancata inibizione) anche quando il PTP potrebbe essere effettivamente coinvolto. Una strategia per aumentare la comprensione dei meccanismi in cui è coinvolta la transizione di permeabilità è rappresentata dall'utilizzo di composti che abbiano come bersaglio il PTP stesso. Per questo motivo è stata iniziata una collaborazione con l'azienda Genextra S.p.A. di Milano avente come scopo la messa a punto di un sistema robotizzato di screening di librerie di composti chimici in grado di portare all'identificazione di nuovi inibitori del PTP ad alta affinità. Da questo screening sono stati identificati 8 "hits" primari successivamente sviluppati grazie a studi di SAR (Structure Activity Relationship). Due di questi composti primari, denominati CngPtP003 e CngPtP006 sono stati caratterizzati dal punto di vista biologico durante questo lavoro di Tesi. Il primo passo importante è stato quello di confermarne le proprietà inibitorie sul PTP in mitocondri di fegato di topo. Abbiamo anche dimostrato che i due inibitori hanno un bersaglio molecolare diverso da quello della CsA, dato sicuramente positivo se si considera da un lato la prospettiva di identificare la struttura del poro tramite esperimenti di binding con composti marcati, dall'altro quello di un loro possibile impiego in modelli di malattia umana in cui è coinvolto il PTP, visti anche i pesanti effetti immunosoppressori della CsA.

Un primo problema si è presentato quando abbiamo deciso di passare allo studio in colture cellulari umane. Infatti, mentre il composto CngPtP003 manteneva le sue proprietà inibitorie, il CngPtP006 risultava essere del tutto inattivo. Tali risultati sono stati confermati in varie linee cellulari umane, sia in mitocondri isolati dalle stesse sia in cellule intatte previa permeabilizzazione. Questi dati hanno portato alla conclusione che l'attività di CngPtP006 è di

tipo specie-specifica, o per lo meno che gli effetti inibitori non si applicano a mitocondri umani (osservazione che induce a cautela nell'extrapolare automaticamente all'uomo dati ottenuti in altri modelli animali). L'ipotesi che abbiamo formulato è quindi, che i mitocondri di fegato di topo e i mitocondri di cellule umane presentino differenze nella modulazione del PTP, che è stata osservata solo in un altro caso per l'induttore ratto-specifico norbormide (Ricchelli *et al.*; 2005; Zulian *et al.*;2007). Questi studi dimostrano inoltre la validità dello HTS per individuare nuovi inibitori del PTP, la cui potenziale utilità per lo sviluppo di farmaci è oggetto di intensi studi.

# Referenze

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.

Andrabi S.A., Sayeed I., Siemen D., Wolf G. and Horn T.F. (2004) Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* 18, 869–871.

Anflous K., Armstrong D.D., Craigen W.J. (2001) Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J Biol Chem.* Jan 19;276(3):1954–60.

Angelin A., Tiepolo T., Sabatelli P., Grumati P., Bergamin N., Golfieri C., Mattioli E., Gualandi F., Ferlini A., Merlini L., Maraldi N.M., Bonaldo P., Bernardi P. (2007) Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 16;104(3):991–6

Anholt R.R., Pedersen P.L., De Souza E.B. and Snyder S.H. (1986) The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 261, 576–583.

Ankarcrona M., Dypbukt J.M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S.A., Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* Oct;15(4):961–73.

Argaud L., Gateau-Roesch O., Muntean D., Chalabreysse L., Loufouat J., Robert D. and Ovize M. (2005) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 38, 367–374.

Baines C.P., Kaiser R.A., Purcell N.H., Blair N.S., Osinska H., Hambleton M.A., Brunskill E.W., Sayen M.R., Gottlieb R.A., Dorn G.W. et al. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658–662.

Baines C.P., Kaiser R.A., Sheiko T., Craigen W.J., Molkenin J.D. (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol.* May;9(5):550–5.

Basso E., Fante L., Fowlkes J., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P. (2005), Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem.* May 13;280(19):18558-61.

Bernardi,P. (1999). Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79, 1127-1155.

Bernardi,P., Vassanelli,S., Veronese,P., Colonna,R., Szabo,I., and Zoratti,M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.* 267, 2934-2939.

Bernardi P. (1992) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem* 267, 8834–8839.

Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A. (2006) The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.* May;273(10):2077-99.

Bernardi,P., Broekemeier,K.M., and Pfeiffer,D.R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 509-517.

Bernardi P. and Azzone G.F. (1981) Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 256, 7187–7192.

Bernardi,P., Petronilli,V., Di Lisa F., and Forte,M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 26, 112-117.

Berson A., Descatoire V., Sutton A., Fau D., Maulny B., Vadrot N., Feldmann G., Berthon B., Tordjmann T. and Pessayre D. (2001) Toxicity of alpidem, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, but not zolpidem, in rat hepatocytes: role of mitochondrial permeability transition and metabolic activation. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 793–800.

Bonaldo P., Braghetta P., Zanetti M., Piccolo S., Volpin D. and Bressan G.M. (1998) Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for Bethlem myopathy. *Hum Mol Genet* 7, 2135–2140.

Bond J.M., Herman B. and Lemasters J.J. (1991) Protection by acidotic pH against anoxia / reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 798–803.

Bond J.M., Chacon E., Herman B. and Lemasters J.J. (1993) Intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 265, C129–C137. *Cell Cardiol* 38, 367–374.

Bono F., Lamarche I., Prabonnaud V., Le Fur G. & Herbert J.M. (1999) Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 457–461.

Brash,A.R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J. Clin. Invest* 107, 1339-1345.

Broekemeier,K.M., Dempsey,M.E., and Pfeiffer,D.R. (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264, 7826-7830.

Camacho Vanegas O., Bertini E., Zhang R.Z., Petrini S., Minosse C., Sabatelli P., Giusti B., Chu M.L. and Pepe G. (2001) Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7516–7521.

Cesura A.M., Pinard E., Schubeneel R., Goetschy V., Friedlein A., Langen H., Polcic P., Forte M.A., Bernardi P. and Kemp J.A. (2003) The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 278, 49812–49818.

Chernyak B.V., Bernardi P. (1996) The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem.* Jun 15;238(3):623 30.

Clarke S.J., McStay G.P. and Halestrap A.P. (2002) Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 277, 34793– 34799.

Connern C.P. and Halestrap A.P. (1992) Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis- trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J* 284, 381–385.

Costantini,P., Chernyak,B.V., Petronilli,V., and Bernardi,P. (1996). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J. Biol. Chem.* 271, 6746-6751

Costantini P., Colonna R. and Bernardi P. (1998) Induction of the mitochondrial permeability transition pore by N-ethylmaleimide depends on secondary oxidation of critical thiol groups. Potentiation by copper-orthophenanthroline without dimerization of the adenine nucleotide translocase. *Biochim Biophys Acta* 1365,385–392.

Crompton M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341, 233–249.

Crompton, M., Costi, A., and Hayat, L. (1987). Evidence for the presence of a reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria [published erratum appears in *Biochem J* 1987 Sep 15;246(3):following 806]. *Biochem. J.* 245, 915-918.

Crompton M., Virji S. and Ward J.M. (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258, 729–735.

Desagher S., Martinou J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* Sep;10(9):369-77.

Di Lisa F., Menabo` R., Canton M. and Petronilli V. (1998) The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1366, 69–78.

Di Lisa F. and Bernardi, P. (1998). Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol. Cell Biochem.* 184, 379-391.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c - dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Ekert, P.G., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

Elz J.S. and Nayler W.G. (1988) Calcium gain during postischemic reperfusion. The effect of 2,4-dinitrophenol. *Am J Pathol* 131, 137–145.

Eriksson, O., Fontaine, E., and Bernardi, P. (1998). Chemical modification of arginines by 2,3-butanedione and phenylglyoxal causes closure of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 273, 12669-12674.

Fontaine E., Eriksson O., Ichas F. and Bernardi P. (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 273, 12662–12668.

Forte M., Gold B.G., Marracci G., Chaudhary P., Basso E., Johnsen D., Yu X., Fowlkes J., Bernardi P., Bourdette D. (2007) Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 1;104(18):7558-63

Frey T.G. and Mannella C.A.. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000 Jul;25(7):319-24.

Ganote C.E., Worstell J. and Kaltenbach J.P. (1976) Oxygen-induced enzyme release after irreversible myocardial injury. Effects of cyanide in perfused rat hearts. *Am J Pathol* 84, 327–350.

Griffiths E.J. and Halestrap A.P. (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia / reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 25,1461–1469.

Griffiths E.J. and Halestrap A.P. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 307,

Gincel D. and Shoshan-Barmatz V. (2004) Glutamate interacts with VDAC and modulates opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 36, 179–186.

Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M. et al. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122, 221–233.

Halestrap A.P. and Brenner C. (2003) The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 10, 1507–1525.

Halestrap A.P., Kerr P.M., Javadov S. and Woodfield K.Y. (1998) Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta* 1366,79–94.

Haworth,R.A. and Hunter,D.R. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 460-467.

He L. and Lemasters J.J. (2002) Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett* 512, 1–7.

Hirsch T., Decaudin D., Susin S.A., Marchetti P., Larochette N., Resche-Rigon M. and Kroemer G. (1998) PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp Cell Res* 241, 426–434.

Hunter,D.R. and Haworth,R.A. (1979b). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 453-459.

Hunter,D.R. and Haworth,R.A. (1979a). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 468-477.

Irwin W.A., Bergamin N., Sabatelli P., Reggiani C., Megighian A., Merlini L., Braghetta P., Columbaro M., Volpin D., Bressan G.M. et al. (2003) Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet* 35, 267–271.

Jennings R.B. and Ganote C.E. (1976) Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury. *Circ Res* 38, 180–191.

Jobsis G.J., Keizers H., Vreijling J.P., de Visser M., Speer M.C., Wolterman R.A., Baas F. and Bolhuis P.A. (1996) Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures. *Nat Genet* 14, 113–115.

Johans M., Milanesi E., Franck M., Johans C., Liobikas J., Panagiotaki M., Greci L., Principato G., Kinnunen P.K.J., Bernardi P. et al. (2005) Modification of permeability transition pore arginine(s) by phenylglyoxal derivatives in isolated mitochondria and mammalian cells: structure–function relationship of arginine ligands. *J Biol Chem* 280, 12130–12136.

Karlsson J., Fong K.S., Hansson M.J., Elmer E., Csiszar K. and Keep M.F. (2004) Life span extension and reduced neuronal death after weekly intraventricular cyclosporin injections in the G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosurg* 101, 128–137.

Keep M., Emer E., Fong K.S.K. and Csiszar K. (2001) Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Res* 894, 327–331.

Kinnally, K.W., Campo, M.L., and Tedeschi, H. (1989). Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 497-506.

Klohn P.C. Bitsch A. and Neumann H.G. (1998) Mitochondrial permeability transition is altered in early stages of carcinogenesis of 2 - acetylaminofluorene. *Carcinogenesis* 19, 1185–1190.

Klohn P.C., Soriano M.E., Irwin W., Penzo D., Scorrano L., Bitsch A., Neumann H.G. and Bernardi P. (2003) Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 10014–10019.

Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R. and Wallace D.C. (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427, 461–465.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F. and Vercesi A.E. (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495, 12–15.

Krammer P.H.. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):789-95.



Krauskopf A., Eriksson O., Craigen W.J., Forte M.A., Bernardi P.. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys. Acta.* 2006 May-Jun;1757(5-6):590-5.

Kroemer G., Reed J.C.. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000 May;6(5):513-519.

Kudin A.P., Debska-Vielhaber G., Vielhaber S., Elger C.E. and Kunz W.S. (2004) The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia* 45, 1478–1487.

Le Fur G., Perrier M.L., Vaucher N., Imbault F., Flamier A., Benavides J., Uzan A., Renault C., Dubroeuq M.C. and Gueremy C. (1983) Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide.I. In vitro studies. *Life Sci* 32, 1839–1847.

Leist M., Nicotera P.. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jul 9;236(1):1-9.

Le Quoc K. and Le Quoc D. (1985) Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. *J Biol Chem* 260, 7422–7428.

Linder M.D., Morkunaite-Haimi S., Kinnunen P.K.J., Bernardi P. and Eriksson O. (2002) Ligand-selective modulation of the permeability transition pore by arginine modification. Opposing effects of p-hydroxyphenylglyoxal and phenylglyoxal. *J Biol Chem* 277, 937–942.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.

Majewski N., Nogueira V., Bhaskar P., Coy P.E., Skeen J.E., Gottlob K., Chandel N.S., Thompson C.B., Robey R.B. and Hay N. (2004) Hexokinase–mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* 16, 819–830.

Massari, S. and Azzone, G.F. (1972). The equivalent pore radius of intact and damaged mitochondria and the mechanism of active shrinkage. *Biochim. Biophys. Acta* 283, 23-29.

McEnery M.W., Snowman A.M., Trifiletti R.R. and Snyder S.H. (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3170–3174.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):355-65.

Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T. and Tsujimoto Y. (2005) Cyclophilin D-dependent

mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652–658.

Nazareth W., Yafei N. and Crompton M. (1991) Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol* 23, 1351–1354.

Neumann H.G., Ambs S. and Bitsch A. (1994) The role of nongenotoxic mechanisms in arylamine carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 102 (Suppl. 6), 173–176.

Nicolli,A., Basso,E., Petronilli,V., Wenger,R.M., and Bernardi,P. (1996). Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 271, 2185-2192.

Nicolli,A., Petronilli,V., and Bernardi,P. (1993). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry* 32, 4461-4465.

Papadopoulos V., Amri H., Boujrad N., Cascio C., Culty M., Garnier M., Hardwick M., Li H., Vidic B., Brown A.S. et al. (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62, 21–28.

Parker M.A., Bazan H.E., Marcheselli V., Rodriguez de Turco E.B. and Bazan N.G. (2002) Platelet-activating factor induces permeability transition and cytochrome c release in isolated brain mitochondria. *J Neurosci Res* 69, 39–50.

Pastorino J.G., Shulga N. and Hoek J.B. (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 277, 7610–7618.

Pastorino J.G., Hoek J.B. and Shulga N. (2005) Activation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res* 65, 10545–10554.

Pastorino J.G. and Hoek J.B. (2003) Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr Med Chem* 10, 1535–1551.

Penzo D., Petronilli V., Angelin A., Cusan C., Colonna R., Scorrano L., Pagano F., Prato M., Di Lisa F. and Bernardi P. (2004) Arachidonic acid released by phospholipase A2 activation triggers Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 279, 25219–25225.

Petronilli,V., Szabo,I., and Zoratti,M. (1989). The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. *FEBS Lett.* 259, 137-143.

Petronilli,V., Nicolli,A., Costantini,P., Colonna,R., and Bernardi,P. (1994). Regulation of the permeability transition pore, a voltage- dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 255-259.

Petronilli V., Cola C., Massari S., Colonna R. and Bernardi P. (1993) Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J Biol Chem* 268, 21939–21945.

Petronilli,V., Cola,C., and Bernardi,P. (1993b). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix  $Ca^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* 268, 1011-1016.

Petronilli,V., Cola,C., Massari,S., Colonna,R., and Bernardi,P. (1993a). Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 268, 21939-21945.

Pfeiffer,D.R., Schmid,P.C., Beatrice,M.C., and Schmid,H.H. (1979). Intramitochondrial phospholipase activity and the effects of  $Ca^{2+}$  plus N-ethylmaleimide on mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 254, 11485-11494.

Plin C., Haddad P.S., Tillement J.P., Elimadi A. and Morin D. (2004) Protection by cyclosporin A of mitochondrial and cellular functions during a cold preservation-warm reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 495, 111–118.

Ricchelli F., Dabbeni-Sala F., Petronilli V., Bernardi P., Hopkins B., Bova S. Species-specific modulation of the mitochondrial permeability transition by norbormide. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jun 30;1708(2):178-86.

Sampson M.J., Decker W.K., Beaudet A.L., Ruitenbeek W., Armstrong D., Hicks M.J. and Craigen W.J. (2001) Immobile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J Biol Chem* 276, 39206–39212.

Schinzel A.C., Takeuchi O., Huang Z., Fisher J.K., Zhou Z., Rubens J., Hetz C., Danial N.N., Moskowitz M.A. and Korsmeyer S.J. (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12005–12010.

Schultheiss H.P. and Klingenberg M. (1984) Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity. *Eur J Biochem* 143, 599–605.

Scorrano,L., Petronilli,V., and Bernardi,P. (1997). On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. *J. Biol. Chem.* 272, 12295-12299.

Scorrano L., Penzo D., Petronilli V., Pagano F. and Bernardi P. (2001) Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- $\alpha$  apoptotic signaling. *J Biol Chem* 276, 12035–12040.

Scorrano L., Ashiya M., Buttle K., Weiler S., Oakes S.A., Mannella C.A. and Korsmeyer S.J. (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55–67.

Siegmund B., Kliez T., Schwartz P. and Piper H.M. (1991) Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 260, H426–H435.

Sorgato M.C., Keller B.U. and Stuhmer W. (1987) Patchclamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. *Nature* 330, 498–500.

Soriano M.E., Nicolosi L. and Bernardi P. (2004) Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin A prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 279, 36803–36808.

Stavrovskaya I.G., Narayanan M.V., Zhang W., Krasnikov B.F., Heemskerk J., Young S.S., Blass J.P., Brown A.M., Beal M.F., Friedlander R.M. et al. (2004) Clinically approved heterocyclics act on a mitochondrial target and reduce stroke-induced pathology. *J Exp Med* 200, 211–222.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebbersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Szabó I., Bernardi P. and Zoratti M. (1992) Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J Biol Chem* 267, 2940–2946.

Szabó, I. and Zoratti, M. (1992). The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 111-117.

Szabó, I. and Zoratti, M. (1991). The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* 266, 3376-3379.

Szabó I., De Pinto V. and Zoratti M. (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett* 330, 206–210.

Szabó I. and Zoratti M. (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett* 330, 201–205.

Trinei M., Giorgio M., Cicalese A., Barozzi S., Ventura A., Migliaccio E., Milia E., Padura I.M., Raker V.A., Maccarana M. et al. (2002) A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* 21, 3872–3878.

Vandenabeele P., Orrenius S., Zhivotovsky B. Serine proteases and calpains fulfill important supporting roles in the apoptotic tragedy of the cellular opera. *Cell Death Differ.* 2005 Sep;12(9):1219-24.

Vinogradov, A., Scarpa, A., and Chance, B. (1972). Calcium and pyridine nucleotide interaction in mitochondrial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 646-654.

Walter L., Miyoshi H., Leverage X., Bernardi P. and Fontaine E. (2002) Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free Radic Res* 36, 405–412.

Wrogemann K. and Pena S.D. (1976) Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet* 1, 672–674.

Wu S., Sampson M.J., Decker W.K., Craigen W.J. Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: effects on cellular respiration. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Oct 13;1452(1):68-78.

Zamzami N. and Kroemer G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 67–71.

Zhu S., Stavrovskaya I.G., Drozda M., Kim B.Y., Ona V., Li M., Sarang S., Liu A.S., Hartley D.M., Wufid C. et al. (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74–78.

Zizi M., Forte M., Blachly Dyson E. and Colombini M. (1994) NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J Biol Chem* 269, 1614–1616.

Zulian A., Petronilli V., Bova S., Dabbeni-Sala F., Cargnelli G., Cavalli M., Rennison D., Stüb J., Laita O., Lee D.J., Brimble M.A., Hopkins B., Bernardi P., Ricchelli F. Assessing the molecular basis for rat-selective induction of the mitochondrial permeability transition by norbormide. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jul;1767(7):980-8.



## Ringraziamenti

Desidero assolutamente ringraziare il Prof. Paolo Bernardi per avermi dato la possibilità di lavorare nel suo gruppo di ricerca, e non solo...

Non conosco nessuno con più passione, entusiasmo e competenza per il proprio lavoro.

Gli auguro veramente di scoprire cos'è il PTP.

Voglio ringraziare poi la Dott.ssa Valeria Petronilli sia per la pazienza e il tempo che mi ha dedicato, sia perché il suo contributo a questo lavoro è stato letteralmente FONDAMENTALE.

Ringrazio la Dott.ssa. Eva Milanese che mi ha insegnato molte cose e con la quale è stato un piacere lavorare.

Infine volevo ringraziare i ragazzi/e del laboratorio con i quali durante i tre e più anni ho avuto modo di lavorare: tutti, chi più chi meno mi hanno insegnato qualcosa. Non vorrei far nomi per non dimenticare qualcuno, anche se Alessia, Emy, Luca e Mageni che erano già lì quando sono arrivato mi hanno insegnato di più.

Veramente infine ringrazio alcune persone del Dipartimento che mi hanno fatto passare dei divertenti momenti di svago tra cui Davide il quale, pur non avendomi insegnato niente di niente e non avendomi neanche mai riempito mezza scatola di puntali, mi ha fatto compagnia in varie pause caffè e/o pranzo, serate e vacanze.

