



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento: Scienze Sperimentali Veterinarie

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO: SCIENZE BIOMEDICHE VETERINARIE E COMPARATE
CICLO 24°**

**RUOLO DELLE PROTEINE ALFA-SINUCLEINA, PARKINA, DJ-1 E PINK1,
MUTATE NELLE FORME FAMILIARI DI MORBO DI PARKINSON,
NEL CONTROLLO DELL'OMEOSTASI MITOCONDRIALE DELLO IONE CALCIO**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Supervisore: Ch.mo Prof. Marisa Brini

Dottorando: Denis Ottolini

Abbreviazioni	Pag 1
Sommario	Pag 4
Abstract	Pag 6
1. Introduzione	Pag 8
1.1 I sintomi clinici e i segni caratteristici del Morbo di Parkinson	Pag 8
1.2 Il Morbo di Parkinson familiare	Pag 10
1.2.1 α-sinucleina (PARK1)	Pag 13
1.2.2 Parkina (PARK2)	Pag 16
1.2.3 PINK1 (PARK6)	Pag 17
1.2.4 DJ-1	Pag 20
1.3 Il processo di mitofagia e il Morbo di Parkinson	Pag 22
1.4 L'omeostasi mitocondriale dello ione calcio	Pag 24
1.5 La produzione di ATP a livello mitocondriale	Pag 27
1.6 L'Omeostasi dello ione Calcio e il morbo di Parkinson	Pag 29
2. Risultati	Pag 31
2.1 Analisi degli effetti della sovraespressione delle proteine α-sin, parkina e DJ-1 sulle funzioni mitocondriali	Pag 31
2.1.1 Analisi dei livelli di espressione di α-sin, parkina e DJ-1 in cellule HeLa e SH-SY 5Y	Pag 32
2.1.2 Misura dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale generati in seguito alla stimolazione di cellule modello che sovraesprimono α-sin, parkina e DJ-1	Pag 33
2.1.3 Analisi della morfologia mitocondriale in cellule HeLa che sovraesprimono α-sin, parkina e DJ-1	Pag 37

2.1.4	Analisi dei livelli di Ca^{2+} nel citoplasma e nel reticolo endoplasmatico (RE) in cellule HeLa che sovraesprimono α -sin, parkina e DJ-1	Pag 38
2.1.5	Analisi degli effetti della sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1 sulla capacità dei mitocondri di accumulare Ca^{2+} in cellule permeabilizzate ed esposte a una concentrazione fissa di Ca^{2+}	Pag 42
2.1.6	Analisi della differenza di potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) in cellule HeLa sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1	Pag 44
2.1.7	Analisi del contributo del rilascio di Ca^{2+} dal RE e dell'entrata di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare nella generazione dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali	Pag 45
2.1.8	Analisi dell'area di contatto tra mitocondri e RE	Pag 47
2.1.9	Misura dell'ATP citosolica e mitocondriale in seguito a stimolazione InsP3-mediata in cellule HeLa sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1	Pag 52
2.2	Caratterizzazione degli effetti di silenziamento delle proteine α -sin, parkina e DJ-1 in cellule modello	Pag 54
2.2.1	Analisi dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali e della morfologia mitocondriale in cellule trattate con siRNA specifici per α -sin, parkina e DJ-1	Pag 54
2.3	α -sinucleina	Pag 60
2.3.1	Modulazione dei livelli endogeni di α -sin mediante incubazione con acido valproico ed analisi degli effetti sui transienti di Ca^{2+} mitocondriale	Pag 60
2.3.2	Analisi degli effetti del trattamento con TAT- α -sin a concentrazioni crescenti	Pag 63
2.3.3	Analisi degli effetti della delezione del dominio C-terminale di α -sin	Pag 65
2.3.4	Analisi degli effetti della sovraespressione di due forme mutanti di α -sin associate a MP nell'uomo	Pag 68
2.4	Studio della relazione di DJ-1 e p53 nel controllo dell'omeostasi	

	mitocondriale di Ca²⁺	Pag 73
2.4.1	Analisi degli effetti di p53 e p53ΔNLS sui transienti di Ca²⁺ mitocondriale	Pag 73
2.4.2	Analisi degli effetti di p53 e p53ΔNLS sui transienti di Ca²⁺ citosolici e sui livelli di Ca²⁺ nel RE	Pag 74
2.4.3	Analisi degli effetti della co-transfezione di DJ-1 in cellule HeLa sovraesprimenti p53 e p53ΔNLS sui transienti mitocondriali di Ca²⁺	Pag 77
2.4.4	Analisi della morfologia mitocondriale in cellule che sovraesprimono p53 e p53ΔNLS in assenza o in presenza di sovraespressione di DJ-1	Pag 78
2.4.5	Analisi del taglio di PARP in cellule HeLa sovraesprimenti p53 in assenza o in presenza di sovraespressione di DJ-1	Pag 81
2.4.6	Analisi della degradazione di p53 in presenza o meno di DJ-1	Pag 82
2.5	Analisi degli effetti della sovraespressione o del silenziamento della proteina PINK1 in cellule HeLa	Pag 83
2.5.1	Analisi degli effetti della sovraespressione di PINK1 sull'omeostasi del Ca²⁺ in cellule HeLa	Pag 84
2.5.2	Analisi degli effetti del silenziamento di PINK1 sull'omeostasi del Ca²⁺	Pag 92
2.5.3	Analisi degli effetti della sovraespressione di PINK1 sulla produzione di ATP mitocondriale in cellule HeLa	Pag 95
3. Discussione		Pag 97
3.1	α-syn, parkina e DJ-1: aspetti comuni nel controllo dell'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale	Pag 98
3.2	DJ-1 e p53: la loro relazione nel controllo della morte cellulare per apoptosi attraverso la modulazione dell'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale	Pag 102
3.3	La proteina chinasi PINK1 e il controllo dell'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale	Pag 103
4. Materiali e Metodi		Pag 106

4.1	Colture cellulari	Pag 106
4.2	Trasfezione	Pag 106
4.3	Anticorpi	Pag 106
4.4	Western blot	Pag 107
4.5	Immunocitochimica	Pag 108
4.6	Isolamento DNA da batteri	Pag 108
4.7	Misura della concentrazione di ione Calcio in cellule vive	Pag 109
4.8	Ricostituzione e misura dell'equorina in cellule vive	Pag 109
4.9	Trattamento con siRNA	Pag 110
4.10	Analisi TMRM	Pag 110
4.11	Analisi della morfologia mitocondriale	Pag 111
4.12	Analisi dei siti di contatto tra mitocondri e RE	Pag 111
4.13	Analisi statistica	Pag 111
4.14	Misura della produzione di ATP in cellule vive	Pag 111
4.15	MAMs	Pag 111
5. Bibliografia		Pag 113

ABBREVIAZIONI

ADP	Adenosina di-fosfato
AEQ	Equorina
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
a.u.	Unità arbitrarie
BK	Bradichinina
BSA	Albumina di siero bovino
Ca ²⁺	Ione Calcio
Ca/P	Calcio/fosfato
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Da	Dalton (unità di misura)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Acido desossiribonucleico
Drp1	Dynamamin related protein 1
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
FBS	Siero fetale bovino
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
GFP	Green fluorescent protein
Grp75	Glucose-related protein 75kDa
HA	Emoagglutinina
HBS	High-buffered saline
HIS	Istamina
HRP	Perossidasi di rafano
HSP75	75 kilodalton heat shock proteins
IBM	Intracellular buffer modificato

InsP3	Inositolo trifosfato
Insp3R	Recettore per l'inositolo trifosfato
KRB	Kreb's Ringer Buffer
LB	Luria Bertani (medium)
LC3	(MAP1LC3B) microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
LUC	Luciferasi
MAMs	Mitochondrial associated ER-membranes
MCU	Mitochondrial calcium uniporter
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MICU1	Mitochondrial calcium uptake 1
MP	Morbo di Parkinson
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
NCLX	Sodium/potassium/calcium exchanger
NCX	Sodium-calcium exchanger
NEM	N-etil-maleimmide
OD	Densità ottica
PARL	Presenilins-associated rhomboid-like protein
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PM	Peso molecolare
PMCA	Plasma-membrane calcium-ATPase
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
RE	Reticolo endoplasmatico

RFP	Red fluoresce protein
ROI	Region of interest
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Giri per minuto
scr	Scramble
SDS	Sodio dodecil-solfato
SDS-PAGE	Sodio dodecil-solfato – elettroforesi su gel di poliacrilammide
siRNA	Small-interfering RNA
SOD	Super-ossido dismutasi
SPCA	Secretory pathway Calcium-ATPase
STS	Staurosporina
TAT	Trans-activator of transcription
TMRM	Tetrametilrodamida metil estere
TBS	Tris-buffered saline
TRAP-1	TNF receptor-associated protein 1
UCHL1	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
UCP	Uncoupling protein
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1
VPA	Acido valproico
α -sin	α -sinucleina

SOMMARIO

Le malattie neurodegenerative, tra le quali il morbo di Parkinson (PD) sono associate a disfunzioni mitocondriali e a stress ossidativo. Inoltre, è stato suggerito che profonde alterazioni della struttura e delle funzioni del reticolo endoplasmatico (RE), una condizione nota come “ER stress”, e disfunzioni del sistema proteosoma-ubiquitina (UPS) siano alcuni dei processi cellulari coinvolti nell’insorgenza di queste malattie. I meccanismi attraverso i quali queste disfunzioni alterano la funzione cellulare sono complessi e solo parzialmente chiariti. Tra questi, gli effetti sulla distribuzione spazio-temporale di un secondo messaggero fondamentale per la corretta comunicazione cellulare, quale lo ione Ca^{2+} , è sicuramente importante. Il programma del mio Dottorato di Ricerca prevedeva di chiarire alcuni di questi aspetti utilizzando modelli cellulari semplici. Infatti, anche se la maggior parte delle forme di PD sono sporadiche e multifattoriali, un numero crescente di mutazioni in geni specifici sono state individuate in alcune forme di malattia familiare. Lo studio delle funzioni delle proteine codificate da questi geni rappresenta quindi uno strumento molto importante per la comprensione degli aspetti molecolari alla base del processo neurodegenerativo. L’aspetto interessante è rappresentato dal fatto che le alterazioni cellulari alla base dei difetti genetici sono le stesse identificate nei casi sporadici. La delucidazione dei meccanismi patogenici delle forme genetiche, oltre a contribuire alla comprensione delle forme più diffuse, potrebbe quindi fornire anche nuove informazioni sui meccanismi cellulari alla base della insorgenza dei processi neurodegenerativi. In particolare, mutazioni in geni diversi (che codificano le proteine α -sinucleina, parkina, DJ-1, PINK1, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-1 (UCHL-1), LRRK2/dardarina e Omi/HTRA2) sono state individuate in pazienti affetti da forme familiari di PD. In tutti i casi l’esatta funzione dei prodotti genici non è ancora completamente chiarita. Il programma di ricerca prevedeva di studiare il loro ruolo nella regolazione dell’omeostasi del Ca^{2+} , con particolare attenzione alla funzione mitocondriale. Uno degli elementi comuni di molte malattie neurodegenerative è infatti rappresentato da disfunzioni del metabolismo mitocondriale del Ca^{2+} . I mitocondri hanno un ruolo centrale nella biologia cellulare, non solo in quanto sono la sede principale di produzione di ATP, ma anche perché svolgono un ruolo importante nel sequestro del Ca^{2+} intracellulare e nella produzione di specie reattive dell’ossigeno e di radicali liberi. Essi sono il primo bersaglio del danno ossidativo e delle disfunzioni che ne derivano, inoltre contengono numerose proteine che regolano il fenomeno della morte cellulare per apoptosi. Perturbazioni della funzionalità mitocondriale portano quindi inevitabilmente a disturbi del funzionamento cellulare e possono dare origine al processo di morte cellulare rendendo le cellule più suscettibili agli insulti neurotossici. Oltre all’omeostasi mitocondriale del Ca^{2+} sono stati analizzati anche altri aspetti

legati alla fisiologia mitocondriale, in particolare il metabolismo energetico e i rapporti tra mitocondri e RE. Dagli esperimenti presentati in questa tesi, che hanno analizzato sia gli effetti della sovraespressione che del silenziamento delle proteine α -sinucleina, parkina, DJ-1 e PINK1, emergono alcuni aspetti comuni molto interessanti: tutte queste proteine sono in grado di modulare l'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale. Per quanto riguarda α -sinucleina, parkina, DJ-1 abbiamo osservato che esse condividono anche il meccanismo con il quale operano questa modulazione: in tutti e tre i casi la loro sovraespressione provoca un aumento di circa il 10% dei contatti tra reticolo endoplasmatico e mitocondri e quindi potenzia il trasferimento di Ca^{2+} tra questi due organelli. Se questa funzione viene a mancare, come abbiamo dimostrato nel caso di α -sinucleina, viene attivata la risposta autofagica. Per quanto riguarda PINK1 abbiamo evidenziato la possibilità che possa regolare l'omeostasi mitocondriale del Ca^{2+} attraverso un'azione bifasica, resta da chiarire se ciò dipenda dalla sua distribuzione nelle membrane mitocondriali e dalla sua attività sulle proteine che regolano il trasporto del Ca^{2+} mitocondriale. Gli esperimenti condotti in cellule permeabilizzate, ed esposte ad una concentrazione di Ca^{2+} pari a 1 μM , sembrano suggerire questa possibilità.

ABSTRACT

Neurodegenerative disorders, such as Parkinson's diseases (PD), are characterized by loss of specific neuronal populations and have been associated with mitochondrial dysfunction and oxidative stress. In addition, endoplasmic reticulum (ER) stress, a severe alteration in the structure and function of the ER with the accumulation of misfolded proteins and alterations in calcium homeostasis, has been suggested to be involved in some neuronal diseases. Finally, disturbed functions of the ubiquitin proteasome system (UPS), responsible for the degradation of cytosolic, ER, and synaptic proteins, is known to contribute to ER stress.

The mechanisms through which these alterations impact on cell function are complex. Among them, however, the effect on the spatio-temporal patterns of a key second messenger, such as Ca^{2+} , most likely plays a key role. My PhD program aimed at clarifying this important issue, focusing on simple pathogenetic models. Indeed, although most forms of PD are sporadic and multifactorial, an increasing number of mutations in specific genes were found in rare, genetic forms of the disease. Understanding the molecular pathogenesis of these forms may give important clues to the understanding of the more common sporadic cases, as well as provide some novel insight into the basic cell biology mechanisms. Specifically, mutations in a set of genes (α -synuclein, parkin and most recently in DJ-1, PINK1, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-1, LRRK2/dardarin and Omi/HTRA2) have been associated with familial cases of PD. In all cases, the normal function of the gene products is not fully understood. Our aim was to study the role of these gene products in subcellular Ca^{2+} homeostasis, with major focus on mitochondria. Mitochondria play a central role in cell biology not only as producers of ATP, but also in the sequestration of Ca^{2+} . Since they are the major site of free radical production in cells, they are also a primary target for oxidative damage and subsequent dysfunction. Mitochondria are also repositories of several proteins which regulates apoptosis. Perturbations in the normal functions of mitochondria will inevitably disturb cell function, may sensitise cells to neurotoxic insults and may initiate cell death.

Alterations in mitochondrial Ca^{2+} signalling could synergize with mitochondrial dysfunction in causing deleterious functional alterations and committing the cell to death.

In addition to the analysis of Ca^{2+} homeostasis, we have analysed other aspects of mitochondrial physiology including the energetic metabolism and the relationship between mitochondria and ER. Common interesting aspects are emerging from the data presented in this thesis, which have considered both the overexpression and the silencing of α -synuclein, parkin, DJ-1 and PINK1 proteins: all of them are able to modulate mitochondrial Ca^{2+} homeostasis. In particular α -synuclein, parkin, DJ-1 operate through the same mechanism by enhancing the ER-mitochondria

contact sites of about 10%, thus enhancing the Ca^{2+} transfer between the two organelles. When this action is missing, as we have documented in the case of α -synuclein, the autophagic process can be activated.

As for PINK1 we have identified an interesting biphasic effect. We have now to clarify whether this action could be related to distinct PINK1 distribution on mitochondrial membranes in respect to its expression levels and whether it may act by regulating the activity of the mitochondrial Ca^{2+} toolkit proteins. Experiments performed in permeabilized cells exposed to fixed 1 μM Ca^{2+} concentration account for this possibility.

1. INTRODUZIONE

1.1 I sintomi clinici e i segni caratteristici del Morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson (MP) è una malattia degenerativa del sistema nervoso centrale. Il MP è la seconda malattia neurodegenerativa più frequente dopo la malattia di Alzheimer: colpisce più dell'1% della popolazione attorno ai 55 anni e più del 3% attorno ai 75 anni (Pankratz et al., 2009). I maschi sono colpiti più frequentemente delle femmine: 19,0% contro il 9,9%; inoltre si assiste a una variabilità anche per quanto riguarda l'etnia: sembra ad esempio ricorrere meno frequentemente tra persone Americane e Africane (Van Den Eeden et al., 2003) . L'incidenza inoltre appare essere più bassa anche in Cina e Giappone (Zhang and Roman, 1993), mentre non si notano differenze tra i diversi Paesi Europei (de Rijk et al., 1997). I motivi di queste diversità sono sconosciuti, tuttavia, potrebbero essere ricondotti a fattori di tipo ambientale (Zhang and Roman, 1993). I pazienti manifestano tremore, assente durante i movimenti e durante il sonno, ma che si accentua con l'affaticamento o con le emozioni; e rigidità muscolare che inizia con il rallentamento dei movimenti (bradicinesia), e poi si manifesta con la difficoltà a iniziare gli stessi (acinesia) e alla quale si aggiungono dolori muscolari. Altri sintomi riscontrabili sono depressione, disturbi del sonno, anomalie gastrointestinali e cardiovascolari. La demenza si manifesta nel 20% circa dei casi (Pankratz et al., 2009). I sintomi della malattia sono causati dalla progressiva morte dei neuroni dopaminergici di una particolare zona del cervello chiamata *substantia nigra pars compacta*. Purtroppo la causa specifica della morte di questi neuroni non è ancora nota. La caratteristica principale riscontrata nei neuroni dopaminergici dei pazienti affetti dalla malattia è la presenza di aggregati proteici intracitoplasmatici chiamati corpi di Lewy. Queste inclusioni sono aggregati di natura proteica, la cui componente principale è una proteina chiamata α -sinucleina (Spillantini et al., 1997). Altre proteine come ubiquitina, UCHL-1 e sinfillina-1 concorrono alla formazione degli aggregati (Lowe et al., 1990; McNaught et al., 2001). La diagnosi univoca della malattia è eseguita post mortem, accertando la presenza dei corpi di Lewy, tuttavia è possibile diagnosticare precedentemente la malattia analizzando i sintomi caratteristici, quali: tremore a riposo, lentezza nei movimenti, rigidità muscolare e instabilità posturale. La zona del cervello colpita dalla malattia, infatti, è sede della produzione e immagazzinamento del neurotrasmettitore dopamina. La mancanza di dopamina comporta un aumento di attività di neuroni GABAergici aventi una funzione inibitoria a livello del sistema motorio corticale con conseguente acinesia, tremori e rigidità. La riduzione dei livelli di dopamina nel bulbo comporta il potenziamento dell'azione inibitoria a livello delle aree locomotrici bulbari che a sua volta risulta in alterazioni della postura e della deambulazione. Dal

punto di vista eziologico, si possono distinguere due forme di MP: quello sporadico (detto anche idiopatico), la cui insorgenza è di origine multifattoriale, e quello giovanile, a insorgenza ereditaria. La maggior parte dei casi è di tipo sporadico; tuttavia, il 5-15% (Wood-Kaczmar et al., 2006) delle persone affette da questo morbo ha un'anamnesi familiare positiva e in questo caso l'esordio è di solito più precoce rispetto al MP idiopatico, si parla per questo di Parkinson giovanile (EOPD – Early-Onset Parkinson Disease). In ogni caso, le due tipologie di MP, condividono caratteristiche simili dal punto di vista dei sintomi clinici (Bonifati et al., 1995; Plante-Bordeneuve et al., 1995). Anche a livello cellulare presentano alcuni segni caratteristici comuni, in particolare, sono presenti disfunzioni mitocondriali, stress ossidativo e alterazioni del sistema del proteasoma, con conseguente difetti nei meccanismi di degradazione delle proteine non funzionali (Werner et al., 2008). Questi elementi comuni hanno fatto in modo che, negli ultimi anni, le forme familiari di MP abbiano rappresentato il modello di studio d'elezione e che la ricerca delle cause molecolari della morte dei neuroni dopaminergici sia profondamente legata allo studio della funzione delle proteine le cui mutazioni sono responsabili di tali forme.

Il coinvolgimento di disfunzioni mitocondriali nella patogenesi del MP risale al 1983 e deriva dalla osservazione casuale che l'assunzione accidentale del composto tossico 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) da parte di un tossicodipendente causò una grave forma di parkinsonismo (Langston, 1987). L'MPTP infatti viene convertito in MPP^+ dalle cellule gliali e captato dai trasportatori della dopamina che lo accumulano all'interno dei neuroni dopaminergici. Tale molecola risultò essere un potente inibitore del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, dando quindi un'indicazione molto forte del possibile coinvolgimento delle disfunzioni dei mitocondri nell'insorgenza della malattia. Modelli sperimentali di animali trattati con MPTP e altri inibitori del complesso I della catena respiratoria, come rotenone e paraquat, hanno poi confermato la capacità di questi composti di indurre neurodegenerazione dopaminergica e parkinsonismo. Altri studi condotti in cellule di origine embriologica molto diversa come per esempio le piastrine, i linfociti, le cellule muscolari, i neuroni della corteccia frontale e della *substantia nigra pars compacta* di pazienti di MP hanno evidenziato una riduzione dell'attività della catena respiratoria mitocondriale, molto spesso associata a mutazioni e delezioni del DNA (Beal, 2005). È noto che una delle principali cause delle mutazioni al DNA mitocondriale risulta essere lo stress ossidativo. I mitocondri, infatti, sono la principale fonte di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno della cellula e difetti nella catena di trasporto degli elettroni aumentano considerevolmente la produzione di radicali liberi che possono danneggiare il DNA o le proteine mitocondriali stesse, dando così il via ad un circolo vizioso che può portare in breve tempo ad un accumulo di danni in grado di innescare la morte cellulare per apoptosi. A supporto di queste

indicazioni, si è osservato un aumento di attività dell'isoforma mitocondriale dell'enzima superossidodismutasi (SOD) nel cervello di pazienti di MP, e ciò ha fatto pensare che venga indotta per contrastare l'eccessiva produzione di ROS a livello mitocondriale (Poirier et al., 1994). Gli altri enzimi "scavengers", come la glutatione perossidasi e la catalasi, sembrano invece avere un'attività ridotta nei tessuti cerebrali di pazienti affetti dal morbo (Ambani et al., 1975; Kish et al., 1985). Anche gli studi condotti su mitocondri purificati da cervelli di topo o di ratto trattati con inibitori del complesso I (MPTP o Rotenone) hanno dimostrato un aumento della produzione dei ROS in proporzione al grado di inibizione del complesso I mitocondriale (Barrientos and Moraes, 1999; Perier et al., 2005). Un altro fattore importante probabilmente coinvolto nell'eziogenesi del MP è il metabolismo della dopamina: infatti i prodotti di ossidazione derivanti dal suo metabolismo ad opera delle monoamminoasidasi possono portare ad un accumulo di ROS eccessivo che risulta così dannoso per i neuroni dopaminergici (Miller et al., 2009).

1.2 Il morbo di Parkinson familiare

Negli ultimi 10 anni sono stati identificati diversi geni le cui mutazioni sono responsabili di forme genetiche di MP: alcune secondo un meccanismo autosomico dominante ed altre secondo un meccanismo autosomico recessivo (Bonifati et al., 1995; De Michele et al., 1995; Lazzarini et al., 1994; Maraganore et al., 1991; Plante-Bordeneuve et al., 1995). In particolare, mutazioni a carico dei geni che codificano parkina (Kitada et al., 1998), PINK1 (Valente et al., 2004) e DJ-1 (Bonifati et al., 2003) sono responsabili di forme di Parkinson di tipo giovanile (EOPD, con comparsa prima dei 40 anni) secondo una modalità autosomico recessiva; mutazioni di α -sinucleina (Bradbury, 2003; Kruger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003; Zarranz et al., 2004), UCHL-1 (Leroy et al., 1998), HtrA2/Omi (Strauss et al., 2005) e LRRK2 (Klein and Schlossmacher, 2006; Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004) sono legate alla insorgenza di forme più senili e caratterizzate da un meccanismo di trasmissione autosomico dominante. La tabella sottostante riassume l'elenco dei geni identificati fino ad oggi, dando indicazione del locus genico, della proteina codifica e della tipologia di MP.

Geni associati alla Malattia di Parkinson						
Gene	Locus	Proteina	Modalità di trasmissione	Freq.	Età esordio e caratteristiche	Istologia
PARK1	<i>4q21</i>	α -sinucleina	dominante	-	Giovanile, progressione rapida, frequente presenza di demenza	Corpi di Lewy α -sinucleina positivi
PARK2	<i>6q25</i>	parkina	recessiva	15% EOPD	20-40 aa, progressione lenta buona risposta alla L-dopa	Molto variabile: assenza di Corpi di Lewy, degenerazione sub. nigra
PARK3	<i>2p13</i>	-	dominante	-	esordio: media 60 aa	Presenza corpi Lewy
PARK4	<i>4q21</i>	triplicazione α -sinucleina	dominante	-	Giovanile, quadro variabile tra MP e demenza con Corpi di Lewy	Corpi di Lewy α -sinucleina positivi
PARK5	<i>4p14</i>	UCHL1	dominante	-	-	-
PARK6	<i>1p35-36</i>	PINK1	recessiva	1-9% EOPD	EOPD	Corpi di Lewy (1 caso studiato)
PARK7	<i>1p36</i>	DJ-1	recessiva	1-2% EOPD	EOPD	-

PARK8	<i>12p11.2-q13.1</i>	LRRK2	dominante	In Italia: 1-2% sporadici; 4-5% familiari	Età di esordio molto variabile, anche tardiva. Quadro clinico simile al MP. Forse lieve aumento di disturbi comportamentali	Variabile: Corpi di Lewy α-sinucleina positivi; degenerazione nigrostriatale aspecifica
PARK9	<i>1p36</i>	ATP13A2	recessiva	-	EOPD, disturbi psichiatrici, demenza	-
PARK 10	<i>1p32</i>	-	dominante	-	esordio: 50 - 60 aa	-
PARK 11	<i>2p13</i>	GIGYF2	dominante	-	-	-
PARK 12	<i>Xq21-q25</i>	-	X-linked	-	-	-
PARK 13	<i>2p12</i>	Omi/HtrA2	dominante	-	Età di esordio tra i 49 e i 77 aa. Quadro clinico simile al Parkinson idiopatico	Questa proteina è localizzata nei corpi di Lewy
PARK 14	<i>22q13.1</i>	PLA2G6	recessiva	-	EOPD, demenza	Corpi di Lewy e aggregati Tau
PARK 15	<i>22q12-q13</i>	FBXO7	recessiva	-	EOPD	-

PARK 16	<i>1q32</i>	-	-	-	-	-
	<i>16q12</i>	VPS35	dominante	-	parkinsonismo	-
	<i>3q27</i>	EIF4G1	dominante	-	parkinsonismo	-

Per meglio comprendere lo scopo ed il contenuto della mia tesi di dottorato, qui di seguito descriverò sinteticamente le caratteristiche funzionali e strutturali delle proteine coinvolte nelle forme genetiche di Parkinson che ho analizzato durante il mio lavoro sperimentale.

1.2.1 α -sinucleina (PARK1)

Il gene è stato mappato nel 1996 sul braccio lungo del cromosoma 4 da ricercatori statunitensi (Polymeropoulos et al., 1997) studiando una famiglia italiana nota come "famiglia di Contursi"; dal nome di una località in provincia di Salerno. Il gene PARK1 codifica la proteina α -sinucleina (α -sin) la cui funzione non è completamente nota, ma sembra coinvolta nella regolazione dell'integrità della membrana delle vescicole sinaptiche (Iwai et al., 1995) e nei processi di traffico e di fusione durante la trasmissione del segnale a livello sinaptico (Auluck et al., 2010). α -sin è una proteina ubiquitaria di 140 amminoacidi, a localizzazione citosolica e nucleare e nelle cellule neuronali è localizzata prevalentemente a livello dell'estremità sinaptica e sembra essere importante per il mantenimento della plasticità neuronale e per i processi che riguardano l'apprendimento di nuovi comportamenti (Clayton and George, 1998). Dal punto di vista strutturale, α -sin contiene tre domini principali: un dominio N-terminale che contiene strutture a α -elica, un dominio centrale idrofobico probabilmente responsabile della formazione di aggregati (amiloidogenico) e un dominio C-terminale, caratterizzato dalla presenza di residui acidi e residui di serina e tirosina e che si pensa possa avere un ruolo nella interazione con altre proteine. I primi due domini contengono un dominio di legame alle membrane probabilmente responsabile dell'associazione di α -sin con le membrane cellulari (Iwai et al., 1995; Jakes et al., 1994). La proteina prodotta per via ricombinante e purificata non presenta una struttura secondaria o terziaria ordinata, tuttavia in seguito al legame con vescicole

contenenti fosfolipidi, può assumere una conformazione ad α -elica nel suo dominio N-terminale (Vekrellis et al., 2004). Fino ad oggi sono state identificate tre mutazioni: A53T, A30P e E46K, tutte localizzate nella porzione N-terminale della proteina (Kruger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997). Sono stati riscontrati alcuni casi di MP familiare sono associati alla duplicazione e triplicazione del gene (*PARK4*) piuttosto che alla presenza di mutazioni (Hardy et al., 2009). Come descritto in precedenza, α -sin è la componente principale dei corpi di Lewy, cioè degli aggregati proteici riscontrati all'interno dei neuroni dopaminergici dei malati di MP. Tuttavia è presente anche in altri tipi di aggregati, come ad esempio i neuriti di Lewy o nelle inclusioni oligodendrogliali, che caratterizzano altre malattie neurodegenerative che per questo motivo vengono raggruppate sotto la definizione comune di “sinucleinopatie” e che condividono alcune caratteristiche con le malattie da prioni, non da ultimo la trasmissibilità per diffusione da una cellula all'altra delle proteine responsabili (Kahle, 2008; Steiner et al., 2011). I meccanismi molecolari che collegano α -sin alla patogenesi di queste malattie tuttavia non sono ancora noti, come in realtà non lo sono nemmeno quelli responsabili dell'insorgenza del MP. L'ipotesi originaria sulla quale si sono concentrati la maggior parte degli studi sosteneva che la presenza di α -sin mutata o la sua sovraespressione favorisse la formazione di aggregati proteici, la cui presenza all'interno della cellula a lungo andare portasse ad un effetto tossico e quindi alla conseguente morte cellulare. Recentemente tuttavia, una nuova idea ha iniziato a emergere: diversi lavori hanno dimostrato come α -sin sia indispensabile per alcune funzioni cellulari, e addirittura in alcune situazioni risulti essere protettiva per le cellule che subiscono particolari insulti. L'ipotesi prevalente al momento è quindi rappresentata dal fatto che l'effetto protettivo e l'effetto tossico di α -sin siano strettamente dipendenti dai suoi livelli di espressione nella cellula. Sembra, infatti, che l'accumulo di α -sin e la conseguente formazione di particolari stati di aggregazione, come ad esempio gli oligomeri o le fibrille (Vekrellis et al., 2004), possano essere dannosi per la cellula, mentre la normale presenza della proteina sia fisiologicamente utile e protettiva. La propensione di α -sin ad oligomerizzare è la conseguenza di un meccanismo di “folding” non corretto, che porta alla formazione di strutture ricche in foglietti beta definite come fibrille. Una quantità elevata di proteina o le presenza di mutazioni nella sua sequenza primaria (Conway et al., 1998; Conway et al., 2000; Karpinar et al., 2009; Trojanowski and Lee, 1998; Winner et al., 2011) potrebbero quindi ostacolarne il corretto ripiegamento durante il processo di maturazione e favorirne l'aggregazione. Diversi studi in vivo hanno dimostrato come interferendo con la capacità di α -sin di creare aggregati, mediante la coespressione, ad esempio, di β -sinucleina (un altro membro della famiglia delle sinucleine, di per se non amiloidogenico) o sovraesprimendo una forma di α -sin delevta del dominio centrale amiloidogenico, gli effetti tossici

neurodegenerativi risultino estremamente blandi o addirittura nulli (Hashimoto et al., 2001; Periquet et al., 2007). Risulta ancora dibattuto però, quali specie di aggregati di α -sin siano tossici. Alcuni lavori, infatti, identificano gli stati protofibrillari di α -sin come dannosi, mentre altri affermano che le fibrille vere e proprie mediano gli effetti tossici (Vekrellis et al., 2011).

Nonostante α -sin abbia una distribuzione prevalentemente citosolica, la sua capacità di aderire alle membrane cellulari (soprattutto se contenenti cardiolipina), la predispone ad avere altre localizzazioni cellulari (Kamp et al., 2010; Nakamura et al., 2011). La presenza di α -sin nei mitocondri è stata riportata in diversi articoli, anche se la sua esatta localizzazione rimane ancora un argomento di dibattito. In alcuni studi condotti su cervelli di topo è stata riscontrata la presenza di α -sin a livello della membrana mitocondriale esterna (Kamp et al., 2010; Li et al., 2007; Nakamura et al., 2011; Zhang et al., 2008), mentre in altri (uno dei quali ha analizzato la distribuzione in cervelli di malati di MP) la sua presenza è stata individuata a livello della membrana interna mitocondriale (Devi et al., 2008; Martin et al., 2006). Numerose evidenze ottenute a livello cellulare dimostrano che la sovraespressione di α -sin interferisce con l'attività del complesso I (Chinta et al., 2010; Devi et al., 2008; Liu et al., 2009; Loeb et al., 2010; Nakamura et al., 2011; Stichel et al., 2007) e IV (Martin et al., 2006) della catena respiratoria mitocondriale e che di conseguenza possa innescare una condizione di aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno e dei livelli di ossido nitrico, stress ossidativo ed il conseguente rilascio di citocromo c (Parihar et al., 2009). In alcuni casi di sovraespressione (sia a livello cellulare che in topi transgenici) sono anche stati riportati difetti della morfologia mitocondriale, quali un aumento del processo di fissione e disorganizzazione delle cristae (Kamp et al., 2010; Nakamura et al., 2011). Tuttavia è importante sottolineare che in questi lavori la sovraespressione di α -sin nelle cellule in coltura veniva ottenuta mediante l'utilizzo di lipidi cationici, una tecnica che comporta un grosso accumulo di proteina, e che la percentuale di mitocondri frammentati nei topi transgenici sovraespressanti α -sin era aumentata solo del 10%, suggerendo un effetto non propriamente massivo. Considerate queste evidenze che suggeriscono che α -sin possa interferire nel controllo della fisiologia mitocondriale, un aspetto importante che riguarda il controllo dell'omeostasi dello ione calcio, ed in particolare di quello mitocondriale (si veda il paragrafo 1.4), è stato fino ad ora poco esplorato. I dati attualmente presenti in letteratura sono contrastanti: alcuni autori propongono che l'associazione di α -sin con le membrane mitocondriali sia responsabile dell'aumento dell'accumulo di Ca^{2+} da parte dei mitocondri e che li renda così più suscettibili a fenomeni di accumulo massivo e danno cellulare (Marongiu et al., 2009; Parihar et al., 2008), altri invece riportano che la sovraespressione di α -sin sia nella sua forma nativa che nella sua forma mutata non esibisce alcun effetto sull'omeostasi dello

ione Ca^{2+} a livello mitocondriale (Hettiarachchi et al., 2009). Il coinvolgimento di α -sin nel controllo dell'omeostasi del calcio cellulare e la possibilità che una sua alterazione potesse essere alla base della morte selettiva dei neuroni dopaminergici sono stati descritti in alcuni lavori che propongono un aumento della permeabilità della membrana plasmatica in seguito alla sovraespressione di α -sin nativa e mutata (Danzer et al., 2007; Furukawa et al., 2006; Lashuel et al., 2002) ed in altri, condotti incubando neuroni in cultura con oligomeri di α -sin, che hanno dimostrato un aumento della trasmissione sinaptica mediata dai recettori per il glutammato di tipo AMPA (Huls et al., 2011). Altri studi ancora invece propongono che l'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare attraverso canali per il Ca^{2+} voltaggio dipendenti non venga influenzato dalla sovraespressione di α -sin, ma che piuttosto si verifichi un difetto nell'ingresso di Ca^{2+} attraverso i canali che vengono attivati in seguito allo svuotamento del contenuto di Ca^{2+} dei depositi cellulari (Parihar et al., 2008).

1.2.2 Parkina (PARK2)

Il locus genico di parkina è stato mappato nel 1997 sul cromosoma 6 in una famiglia giapponese i cui membri manifestavano Parkinson giovanile a trasmissione autosomica recessiva (Matsumine et al., 1997). Il gene mutato in questione è stato identificato da Kitada et al., 1998, e battezzato con il nome di "parkin". Ad oggi sono state identificate più di cento mutazioni (mutazioni puntiformi o delezioni) che rappresentano la causa più frequente di morbo di Parkinson familiare (West and Maidment, 2004). Parkina è una proteina di 465 amminoacidi espressa in diversi tessuti: nel muscolo scheletrico, nel cuore e nel cervello (Kitada et al., 1998). Nelle cellule neuronali si localizza nel corpo cellulare e a livello delle terminazioni presinaptiche (D'Agata et al., 2002; Stichel et al., 2000). Parkina è una E3-ubiquitin ligasi, cioè una componente del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), e catalizza il legame della proteina ubiquitina alle catene polipeptidiche che devono essere degradate attraverso il proteasoma (Shimura et al., 2000). Mutanti di *Drosophila* nei quali il gene di parkina è stato inattivato presentano difetti mitocondriali, aumento di stress ossidativo, degenerazione muscolare e sterilità maschile (Greene et al., 2003). Topi knock-out per parkina presentano livelli ridotti delle proteine mitocondriali coinvolte nel processo della fosforilazione ossidativa e aumento dell'ossidazione di lipidi e proteine (Palacino et al., 2004). Parkina sembra avere un ruolo protettivo, in quanto la sua sovraespressione in colture cellulari previene il rigonfiamento mitocondriale e l'apoptosi indotta da condizioni di stress cellulare (Darios et al., 2003). La proteina inoltre è coinvolta nel processo di trascrizione e replicazione del DNA

mitocondriale (Kuroda et al., 2006b). Considerata la sua attività enzimatica, per lungo tempo si è pensato che la perdita della sua funzione di conseguenza alla presenza di mutazioni fosse principalmente responsabile di difetti del sistema del proteasoma con il conseguente accumulo di proteine ed aumento della tossicità cellulare. Recentemente è emerso un nuovo ed importante ruolo di parkina nella regolazione della fisiologia mitocondriale legato alla sua capacità di ubiquitinare proteine mitocondriali ed attivare la eliminazione selettiva dei mitocondri danneggiati attraverso il processo che prende il nome di mitofagia. Questo aspetto verrà discusso in dettaglio nel paragrafo 1.3 in quanto nella regolazione del processo di mitofagia interviene anche la proteina PINK1. Per quanto riguarda l'associazione della perdita di funzione di Parkina ed una eventuale disomeostasi dello ione Ca^{2+} mitocondriale non ci sono dati in letteratura, ad eccezione di un articolo che riporta che le cellule in cui l'espressione di parkina è stata silenziata e le cellule che esprimono forme mutanti di Parkina presentano un aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare che le rende più suscettibili al danno causato dalla neurotossina 6-idrossidopamina (6HODA), una forma ossidata della dopamina che induce parkinsonismo (Sandebring et al., 2009). Tale aumento dei livelli di Ca^{2+} dipende probabilmente da un aumento della attività di fosfolipasi C gamma, che risulta maggiormente fosforilata.

1.2.3 PINK1 (*PARK 6*)

Il locus genico è stato identificato sul cromosoma 1 studiando una famiglia siciliana (Valente et al., 2001) e alcune famiglie europee (Valente et al., 2002). Mutazioni a carico di questo gene che codifica la proteina PINK1, sono state inizialmente identificate in tre famiglie, una spagnola e due italiane, colpite da una forma autosomica recessiva di Parkinson di tipo giovanile (Valente et al., 2004). PINK1 è una proteina di 581 aminoacidi altamente conservata: il suo dominio N-terminale contiene una sequenza di localizzazione mitocondriale, mentre l'estremità C-terminale ha attività serina/treonina chinasi (Silvestri et al., 2005; Valente et al., 2004). Questi due domini sono separati da una regione centrale che contiene un dominio transmembrana responsabile del legame di PINK1 con le membrane mitocondriali. La topologia di PINK1 e la sua distribuzione a livello dei diversi compartimenti mitocondriali sono state a lungo discusse ed il modello attualmente accettato prevede che esista una forma ancorata alla membrana mitocondriale interna attraverso il dominio transmembrana e che presenti il dominio N-terminale che sporge nella matrice mitocondriale ed il dominio C-terminale con attività chinasi rivolto verso lo spazio intermembrana (Zhou et al., 2008). La quantità di proteina PINK1 a livello della membrana mitocondriale interna è molto bassa

ed è regolata dall'attività della proteasi mitocondriale PARL (presenilin-associated rhomboid-like) che la taglia livello del residuo Alanina in posizione 103 (Lin and Kang, 2008) rimuovendone il dominio N-terminale e rendendola in forma solubile che viene rapidamente degradata. L'esistenza di una forma di PINK1 "full-length" di circa 65 kDa ed una forma accorciata di circa 53 kDa crea una notevole complessità nello studio della funzione di questa proteina (Haque et al., 2008; Lin and Kang, 2008; Weihofen et al., 2009). L'idea che al momento sembra più verosimile è che la forma full-length sia quella funzionale. In normali condizioni PINK1 viene rapidamente internalizzata nei mitocondri e tagliata per poi essere esportata nel citosol ed essere degradata velocemente dal proteasoma (Narendra et al., 2010). In seguito ad un insulto tossico o alla variazione del potenziale di membrana mitocondriale, l'internalizzazione non avviene più e PINK1 si accumula sulla membrana mitocondriale esterna dei mitocondri danneggiati, dove funge da segnale per il reclutamento di parkina ed il conseguente innesco del processo di mitofagia (Lin and Kang, 2008; Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010; Pogson et al., 2011). Tuttavia questa ipotesi è in contrasto con i dati riportati in un articolo in cui si mostra che la sovraespressione della forma troncata citosolica è in grado di conferire protezione in seguito al trattamento con la tossina MPTP in vitro e in vivo (Haque et al., 2008). Risulta quindi evidente come siano necessari ulteriori studi per rivelare a fondo l'esatta funzione e processamento della proteina.

La maggior parte delle mutazioni associate al MP sono localizzate nel dominio con attività chinasi e ne riducono l'attività enzimatica, suggerendo che l'insorgenza del MP potesse essere legata alla perdita di tale funzione. A supporto di questa ipotesi si è osservato che l'espressione di un mutante artificiale "kinase-dead" non conferiva neuroprotezione da insulti tossici a differenza dell'espressione di PINK1 nativa (Beilina et al., 2005). Tuttavia altri studi non confermarono questa ipotesi (Silvestri et al., 2005). La sovraespressione di PINK1 protegge le cellule dalla depolarizzazione mitocondriale e dall'apoptosi indotta dal trattamento cellulare con l'inibitore del proteasoma MG132 o con staurosporina. Mutazioni che inattivano la proteina provocano sterilità maschile, e degenerazione muscolare e neuronale in *Drosophila* (Clark et al., 2006). Si è anche osservato che la sovraespressione di parkina è in grado di compensare i difetti mitocondriali indotti dall'assenza di PINK1 (Yang et al., 2006), ma non la sensibilità di cellule che esprimono forme mutanti ad agenti apoptotici. La perdita di funzione di PINK1 ha effetti anche sulla morfologia mitocondriale di cellule umane in coltura (Exner et al., 2007) e anche in questo caso, l'espressione di parkina recupera il fenotipo alterato. Da questi esperimenti è risultato chiaramente che non solo l'interazione PINK1 e parkina è essenziale per il mantenimento dell'integrità mitocondriale, ma anche che fanno parte della stessa via di segnalazione e che parkina agisce a valle di PINK1. Resta ancora molto da chiarire per identificare i bersagli molecolari precisi di PINK1 ed è ancora da

dimostrare se gli effetti osservati siano interamente associati alla sua attività chinasi. È stato suggerito che PINK1 eserciti la sua funzione protettiva svolgendo un ruolo anti-apoptotico (Petit et al., 2005) grazie alla fosforilazione di alcuni substrati mitocondriali. Tuttavia, nonostante la documentata attività serina/treonina chinasi, i bersagli naturali di fosforilazione non sono ancora stati identificati. Alcune proteine sono risultate fosforilabili da PINK1 in vitro, tra le quali anche parkina (Kim et al., 2008). I possibili bersagli cellulari sono essenzialmente tre proteine: i) TRAP-1 (TNF-receptor associated protein 1, anche conosciuta con il nome di heat shock protein 75, Hsp75), una proteina mitocondriale con attività di chaperone molecolare (Pridgeon et al., 2007). ii) HtrA2/OMI, una proteina pro-apoptotica le cui mutazioni sono in alcuni casi state associate all'insorgenza di forme familiari di MP (Plun-Favreau et al., 2007) e iii) Miro, una GTPasi atipica presente a livello della membrana mitocondriale esterna, ed importante nel controllo della motilità dei mitocondri (Wang et al., 2011b).

Per quanto riguarda PINK1 e la sua possibile relazione con l'omeostasi di Ca^{2+} mitocondriale alcuni studi hanno proposto che possa interferire con i meccanismi di trasporto del calcio mitocondriale descritti in dettaglio nel paragrafo 1.4. Il primo lavoro apparso in letteratura sull'argomento suggeriva che i mitocondri di cellule che sovraesprimevano una forma mutata di PINK1 andavano incontro ad un accumulo eccessivo di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale e che questo accumulo poteva essere prevenuto trattando le cellule con rosso rutenio, un inibitore della proteina che media l'ingresso di Ca^{2+} nei mitocondri, l'uniporina (Marongiu et al., 2009). Un altro lavoro che analizzava gli effetti dell'assenza di PINK1 suggeriva invece che l'assenza di PINK1 compromettesse l'attività dell'antiporto $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, che rappresenta il principale meccanismo di estrusione del Ca^{2+} dai mitocondri, portando così a quel processo di sovraccarico noto come "calcium overload" e conseguente produzione di ROS, perdita del potenziale mitocondriale di membrane ed alterata respirazione mitocondriale (Gandhi et al., 2009). Gli stessi autori hanno recentemente proposto che in tipi cellulari diversi con esigenze metaboliche differenti, come ad esempio in cellule muscolari ed in cellule neuronali, la risposta possa essere diversa. In cellule muscolari infatti l'assenza di PINK1 aumenta il potenziale elettrochimico di membrana mitocondriale e la capacità dei mitocondri di tamponare gli aumenti di concentrazione di Ca^{2+} citosolico, mentre nelle cellule neuronali induce una riduzione del potenziale elettrochimico di membrana e sovraccarico di Ca^{2+} (Yao et al., 2012). In un terzo lavoro è invece stato dimostrato che l'assenza di PINK1 provoca una perdita del potenziale di membrana mitocondriale e di conseguenza la perdita della capacità di accumulare Ca^{2+} da parte dei mitocondri. In queste condizioni anche la sintesi di ATP risulta compromessa; tuttavia gli autori escludono un effetto sulle vie di efflusso del Ca^{2+} (Heeman et al., 2011). Nonostante quindi il bersaglio molecolare colpito dalla perdita di funzione di PINK1 non sia

definito univocamente, l'aspetto comunque condiviso è che l'assenza di PINK1 possa compromettere la normale funzionalità mitocondriale, predisponendo così le cellule a essere maggiormente vulnerabili ad un sovraccarico di Ca^{2+} (Akundi et al., 2011).

1.2.4 DJ-1 (*PARK 7*)

Il locus genico di *PARK 7* mappa sul cromosoma 1 e mutazioni a carico di questo gene sono associate a una forma rara di MP di tipo autosomico recessivo (Bonifati et al., 2003). I pazienti affetti da tale forma di MP sviluppano i sintomi attorno ai 40 anni e presentano severe anomalie a livello dei neuroni dopaminergici nigro-striatali (van Duijn et al., 2001). Il gene in questione, codifica una proteina di 189 aminoacidi (Nagakubo et al., 1997) chiamata DJ-1 ed espressa sia a livello cerebrale sia nei tessuti periferici (Bonifati et al., 2003; Kumaran et al., 2009; Zhang et al., 2005). DJ-1 è una proteina multifunzionale. DJ-1 è stata definita un'atipica perossireduttasi perossiredossina-simile (Andres-Mateos et al., 2007). A livello subcellulare, questa proteina ha una distribuzione prevalentemente citosolica, anche se si è visto che una frazione è localizzata nel nucleo, nella matrice mitocondriale e nello spazio intermembrana mitocondriale (Zhang et al., 2005). E' stato anche suggerito che in condizioni di stress ossidativo avvenga una sovraespressione di DJ-1 ed una sua redistribuzione cellulare a livello mitocondriale e nucleare (Ashley et al., 2009; Canet-Aviles et al., 2004; Junn et al., 2009; Lev et al., 2008). Per quanto riguarda la sua funzione è stato suggerito che possa avere un ruolo neuroprotettivo, probabilmente attraverso un'azione antiossidante (Andres-Mateos et al., 2007; Canet-Aviles et al., 2004) e che possa influenzare le funzioni e la morfologia mitocondriale (Hayashi et al., 2009) anche attraverso l'attivazione della via autofagica (Krebiehl et al., 2010), condividendo quindi tale funzione con le proteine PINK1/parkina. DJ-1 sembra svolgere il suo ruolo citoprotettivo fungendo sia da sensore di radicali liberi, che da "scavenger" in condizioni di stress ossidativo. Questo potere antiossidante (dimostrato in cellule di mammifero esposte a uno stress ossidativo come quello indotto dal paraquat o dall' H_2O_2) sembra dovuto alla presenza di residui di cisteina (e quindi di gruppi SH) che si ossidano in modo da detossificare le cellule dai ROS esercitando così un ruolo citoprotettivo (Canet-Aviles et al., 2004; Mitumoto et al., 2001). A conferma di ciò si è visto che i neuroni dopaminergici di topi KO per DJ-1 sono più suscettibili alla morte e al danno ossidativo dovuto a tossine come l'MPTP (Kim et al., 2005) e il paraquat (Yang et al., 2007). Al contrario, la sovraespressione di DJ-1 conferisce protezione (Kim et al., 2005; Paterna et al., 2007). Oltre ad un ruolo nella protezione da stress ossidativo ad DJ-1 è stato attribuito anche un ruolo nella regolazione della trascrizione genica: si è visto infatti che può agire da co-attivatore nella trascrizione di alcuni geni che

codificano fattori di trascrizione, soprattutto quelli deputati alla protezione della cellula morte cellulare per apoptosi ed in seguito a stress ossidativo (Vasseur et al., 2009; Xu et al., 2005; Zhong and Xu, 2008). Recentemente, lo studio degli effetti della delezione di DJ-1 in fibroblasti embrionali di topo knock out per DJ-1 sulla morfologia mitocondriale ha rivelato alcuni aspetti comuni alle proteine PINK1/parkina: infatti anche in questo caso si è osservato un aumento della frammentazione mitocondriale, suggerendo che anche DJ-1 possa essere coinvolto nella regolazione di processi di fusione e fissione mitocondriale, anche se nessuna delle proteine deputate a questi processi è risultata alterata dall'assenza di DJ-1 (Blackinton et al., 2009; Krebiehl et al., 2010). Per quanto riguarda DJ-1 ed il suo possibile coinvolgimento nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} , i dati disponibili sono piuttosto limitati: la misura della concentrazione di Ca^{2+} citosolica in condizioni di riposo nelle fibre muscolari dei topi knockout ha rivelato un aumento dei livelli basali, mentre la quantità di Ca^{2+} rilasciata dai depositi intracellulari in seguito a depolarizzazione era ridotta (Shtifman et al., 2011). Il collegamento più evidente tra disomeostasi dello ione e la perdita della funzione di DJ-1 viene da uno studio condotto sui neuroni dopaminergici di topi KO per DJ-1. Questi neuroni sono caratterizzati dalla presenza di canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti di tipo L che garantiscono l'attività di "pacemaking". L'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare durante l'attività di "pacemaking" innesca uno stress ossidativo che i mitocondri sono in grado di compensare andando incontro ad una blanda depolarizzazione. Quando però questo ruolo mitocondriale è compromesso, per esempio in seguito al trattamento con tossine mitocondriali od in seguito alla perdita di funzione di DJ-1, l'ingresso di Ca^{2+} durante l'attività di "pacemaking" rende i neuroni più vulnerabili allo stress ossidativo. Si è osservato che neuroni dopaminergici dei topi KO per DJ-1 presentano una riduzione significativa di due proteine disaccoppianti mitocondriali, UCP4 e UCP5, spiegando così la loro ridotta capacità di fronteggiare l'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare con una lieve depolarizzazione protettiva (Guzman et al., 2010).

Considerata la funzione anti-apoptotica di DJ-1 ed il fatto che DJ-1, prima ancora di essere associata al MP, sia stata inizialmente identificata come una proteina oncogenica, è interessante notare la sua relazione in termini di attività e di regolazione dei livelli di espressione rispetto ad un'altra proteina fondamentale nel controllo del processo oncogenico, l'oncosoppressore p53. Numerosi studi hanno riscontrato un aumento dei livelli espressione di DJ-1 in tumori di origine cellulare diversa, suggerendone così un ruolo nel processo di trasformazione neoplastica (Hinkle et al., 2011; Kim et al., 2005; Kim et al., 2010; Nagakubo et al., 1997).

Considerato che in questa tesi ho analizzato la relazione tra DJ-1 e p53 nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale, a questo punto della introduzione voglio illustrare brevemente ciò che è noto in letteratura sulla possibilità di una loro interazione ed il morbo di PD. p53 è un noto

oncosoppressore che agisce attraverso due modalità principali: una trascrizionale che prevede l'attivazione di geni che codificano proteine coinvolte nella attivazione della morte cellulare per apoptosi quali ad esempio Bax, FAS, NOXA and PUMA, ed una non trascrizionale che prevede l'attivazione della cosiddetta via mitocondriale, che, attraverso la modulazione delle proteine della famiglia di Bcl-2, induce un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna, rendendo quindi le cellule più suscettibili alla morte cellulare per apoptosi (Brady and Attardi, 2010). Ad eccezione dei dati presentati in un unico articolo (Shinbo et al., 2005), numerosi studi indipendenti hanno mostrato come DJ-1 sia in grado di contrastare l'attività di p53. E' stato dimostrato in modelli cellulari diversi che i livelli di espressione delle due proteine sono inversamente regolati: il silenziamento di DJ-1 porta ad un aumento dei livelli di espressione di p53 (Breitaud et al., 2007), ed il silenziamento di p53 probabilmente porta ad un aumento dei livelli di espressione di DJ-1 (Rahman-Roblick et al., 2008). DJ-1, oltre a regolare l'espressione di p53, è in grado di modularne l'attività trascrizionale sul promotore di Bax (Fan et al., 2008a; Fan et al., 2008b) riducendone così ulteriormente i livelli di espressione. È stato inoltre dimostrato che DJ-1 subisce un taglio proteolitico da parte della caspasi 6, e che il frammento C-terminale che si genera sia responsabile del fenotipo protettivo antiapoptotico di DJ-1 attraverso la via mediata da p53 (Giame et al., 2010). Quando, in seguito alla presenza di mutazioni, il processamento di DJ-1 da parte di caspasi-6 non avviene correttamente, viene a mancare l'effetto protettivo ed i neuroni risultano più suscettibili agli insulti neurotossici.

1.3 Il processo di Mitofagia e il Morbo di Parkinson

Le cellule neuronali, a differenza degli altri tipi cellulari, per sopperire alla domanda di ATP, dipendono quasi completamente dal processo della fosforilazione ossidativa, in quanto la loro capacità glicolitica è estremamente limitata o addirittura assente (Herrero-Mendez et al., 2009; Yao et al., 2012). Per questo motivo è molto importante per i neuroni controllare finemente la perfetta funzionalità dei mitocondri in modo da mantenere intatta la loro capacità di produrre energia ed evitare tutti gli effetti deleteri indotti da una disfunzionalità mitocondriale come la produzione di ROS o il rilascio di citocromo c in grado di innescare apoptosi. Le cellule eucariotiche hanno per questo motivo sviluppato un sistema di controllo della qualità mitocondriale, che prevede di riconoscere e degradare efficacemente i mitocondri danneggiati, impedendo la loro fusione con i mitocondri sani e preservando così le funzioni cellulari. Questo sistema, evoluto da quello generico della macroautofagia (di cui ne conserva i meccanismi molecolari principali), è definito mitofagia

(Kanki and Klionsky, 2010). Uno dei sintomi precoci di danno mitocondriale è la perdita del potenziale di membrana ($\Delta\psi_m$) e, nelle cellule di mammifero, la depolarizzazione innesca direttamente l'attivazione di mitofagia (Rodriguez-Enriquez et al., 2006; Twig et al., 2008). Screening genetici recenti hanno permesso di individuare in lievito la proteina chiamata Atg32, localizzata sulla membrana mitocondriale esterna e in grado di interagire con Atg8 e Atg11 (due note proteine utilizzate nel processo di macroautofagia) per promuovere la degradazione specifica dei mitocondri, senza influire sugli altri organelli (Kanki et al., 2009; Okamoto et al., 2009; Yorimitsu and Klionsky, 2005). L'omologo di Atg32 nei mammiferi non è ancora stato scoperto, tuttavia diverse caratteristiche strutturali di Atg32 sono state riconosciute nella proteina Nix/BNIP3L. Al momento però, pur essendo Nix espressa in maniera ubiquitaria, la sua funzione è stata documentata solo nel sistema ematopoietico durante la maturazione dei reticolociti in eritrociti (Chen et al., 2008; Sandoval et al., 2008; Schweers et al., 2007; Zhang and Ney, 2008, 2009). Per quanto riguarda la relazione tra MP e mitofagia, i primi lavori risalgono a poco meno di 5 anni fa. Nel 2008 venne per la prima volta dimostrato che in cellule HeLa e HEK293 trattate con CCCP (m-clorofenilidrazone), un composto chimico in grado di collassare completamente il $\Delta\psi_m$, parkina viene selettivamente reclutata ai mitocondri, inducendo la scomparsa degli stessi entro 48 ore dal trattamento. L'ipotesi suggerita dall'articolo, è che i mitocondri fossero degradati mediante macroautofagia (Narendra et al., 2008). Recentemente è stato dimostrato che Nix promuove la traslocazione di parkina ai mitocondri e la conseguente mitofagia in cellule MEF (Ding et al., 2010). Lavori successivi hanno poi dimostrato che la traslocazione di parkina ai mitocondri richiede la presenza di PINK1, e che l'accumulo di PINK1 sulla membrana mitocondriale esterna provoca il reclutamento di parkina ai mitocondri anche in assenza di difetti di $\Delta\psi_m$ (Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010; Vives-Bauza et al., 2010). Di conseguenza a questa prima osservazione, durante questi ultimi anni, numerosi studi hanno indagato il ruolo e le interazioni di PINK1 e parkina nel controllo della fisiologia mitocondriale cercando di identificare quali fossero i segnali ed i bersagli molecolari per il riconoscimento dei mitocondri danneggiati. Come descritto in precedenza, PINK1 sembra essere inserita sia nella membrana mitocondriale esterna che in quella interna, mantenendo il dominio C-terminale chinasi rivolto verso il citosol e lo spazio intermembrana, rispettivamente (Zhou et al., 2008). Sia l'attività chinasi che la localizzazione mitocondriale di PINK1 sono risultate essenziali per il reclutamento di parkina ai mitocondri, tuttavia la possibilità che parkina sia direttamente fosforilata da PINK1 è ancora dibattuta. Sha e collaboratori hanno dimostrato che parkina viene fosforilata da PINK1 in vitro e che la variazione dei livelli di PINK1 in cellule SH-SY5Y influisce direttamente sui livelli di fosforilazione di parkina (Sha et al., 2010). Tuttavia, un altro gruppo di ricerca non è riuscito a confermare questo

dato (Vives-Bauza et al., 2010). Per quanto riguarda invece la possibilità che PINK1 sia bersaglio di ubiquitinazione da parte di parkina non sembra esserci nessuna evidenza (Vives-Bauza et al., 2010), piuttosto sono stati identificati altri bersagli mitocondriali interessanti: quali VDAC1 (Voltage-dependent anion channel) (Chan et al., 2011; Geisler et al., 2010), le mitofusine Mfn1 e Mfn2 (Gegg et al., 2010; Ziviani et al., 2010), indispensabili per il mantenimento del corretto processo di fusione dei mitocondri, Drp1 (Wang et al., 2011a) che regola la fissione mitocondriale, Bcl-2 (Chen et al., 2010) e la proteina GTPasi Miro, che funge da adattatore per il trasporto dei mitocondri lungo i microtubuli all'interno delle cellule (Wang et al., 2011b). Il fatto che la proteina Miro sia bersaglio di parkina è di particolare interesse soprattutto alla luce del fatto che è stato dimostrato che essa viene ubiquitinata solo dopo essere stata fosforilata da PINK1, che interviene riconoscendo i mitocondri danneggiati ed impedendo il loro movimento e quindi ancora una volta prevenendo la fusione con il resto del reticolo mitocondriale.

Per riassumere quindi appare evidente che il sistema parkina/PINK1 attraverso la condivisione dei bersagli mitocondriali giochi un ruolo essenziale al mantenimento della fisiologia mitocondriale: tuttavia mentre la loro azione nel mantenere la morfologia mitocondriale è stata intenso oggetto di studio, alcuni parametri essenziali alla funzionalità dell'organello, come per esempio il controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} , sono stati fino ad ora trascurati. Di questi aspetti mi sono occupato durante lo svolgimento del mio Dottorato di Ricerca e per meglio comprendere il contenuto della tesi qui di seguito illustrerò brevemente alcuni concetti sui meccanismi di trasporto dello ione, soprattutto a livello mitocondriale.

1.4 L'omeostasi mitocondriale dello ione calcio

Il Ca^{2+} è il secondo messaggero più comune nelle cellule eucariotiche, esso regola numerosi processi cellulari quali la contrazione muscolare, la proliferazione e la morte cellulare e la propagazione dell'impulso nervoso (Berridge, 1993; Carafoli et al., 2001). Nell'ambiente extracellulare, questo ione presenta una concentrazione di 1mM; nell'ambiente citosolico, invece, la concentrazione, in condizioni di riposo si aggira intorno a valori di 100-200 nM a seconda del tipo cellulare. In risposta a segnali elettrici o chimici che provengono dall'ambiente extracellulare la concentrazione dello ione può aumentare anche di 100 volte in poco tempo arrivando anche a valori di 1-10 mM. Tale aumento si verifica sia perché si assiste ad un ingresso di Ca^{2+} attraverso canali della membrana plasmatica, sia perché viene rilasciato il Ca^{2+} sequestrato all'interno dei depositi intracellulari quali il reticolo endo/sarcoplasmatico e l'apparato di Golgi attraverso

l'apertura di canali quali il recettore dell'inositolo 1,4,5 trisfosfato (Berridge, 2007) e del recettore della rianodina (Brini, 2004). Perché sia garantita la corretta segnalazione cellulare, tali aumenti di concentrazione devono essere transienti e ripristinati ai livelli basali in brevissimo tempo. Per questo motivo esistono dei sistemi di estrusione del Ca^{2+} dalla cellula, come le pompe Ca^{2+} -ATPasi (PMCA) e lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ della membrana plasmatica (Lytton, 2007) e sistemi di trasporto come le pompe Ca^{2+} ATPasi del reticolo endo/sarcoplasmatico (SERCA) e dell'apparato di Golgi (SPCA) che riaccumulano Ca^{2+} nei depositi intracellulari (Brini and Carafoli, 2009).

Un ruolo essenziale nel mantenere l'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare, è svolto anche dai mitocondri, che quindi, oltre a rappresentare il principale compartimento cellulare deputato alla produzione dell'energia cellulare sotto forma di ATP, rivestono un ruolo importante anche nella regolazione di altri processi cellulari. Dal punto di vista strutturale, questi organelli sono costituiti da due membrane: la membrana esterna e la membrana interna. La prima è a contatto con il citoplasma e permette il passaggio di piccole molecole (con PM < di 5000 Da) e ioni grazie alla presenza di proteine intrinseche globulari definite porine. La membrana interna forma delle invaginazioni, chiamate "cristae" mitocondriali, che rappresentano un'espansione della superficie di membrana e sono la sede dei complessi enzimatici della catena respiratoria. La membrana interna è altamente selettiva: è infatti impermeabile alla maggior parte delle piccole molecole e ioni (compresi i protoni) e possiede trasportatori di membrana altamente specifici che consentono lo scambio di metaboliti e ioni con l'ambiente citosolico. Questa membrana è fondamentale per le funzioni mitocondriali, infatti in essa risiedono i complessi della catena respiratoria, l'ATP sintasi e altri trasportatori di membrana. Lo spazio tra le due membrane, è detto spazio intermembrana ed è attraversato da strutture simili alle giunzioni serrate che rendono contigue zone della membrana interna ed esterna. Il compartimento delimitato dalla sola membrana interna è invece definito matrice mitocondriale. La membrana mitocondriale interna è la sede dei processi di fosforilazione ossidativa: i complessi della catena respiratoria permettono il trasferimento degli elettroni dagli equivalenti riducenti (NADH, FADH_2) all'ossigeno e pompano i protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana (si veda il paragrafo 1.5). Si genera così un gradiente protonico che si traduce in un potenziale elettrico negativo all'interno dei mitocondri (-180 mV) e in un gradiente di pH. Tale gradiente elettrochimico viene utilizzato per la produzione di ATP ad opera dell'ATP sintasi, che sfrutta l'energia liberata dal rientro di H^+ nella matrice. Il gradiente elettrochimico consente anche l'ingresso di ioni Ca^{2+} nella matrice mitocondriale attraverso un sistema di trasporto a bassa affinità chiamato uniporto. Il raggiungimento dell'equilibrio elettrochimico, che porterebbe la concentrazione di Ca^{2+} all'interno dei mitocondri a valori intorno a 0.1 M e quindi incompatibili con le funzioni mitocondriali, è impedito dall'azione di sistemi di

efflusso quali lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondriale, e lo scambiatore $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Nicholls, 2005). L'uniporto è un trasportatore aspecifico caratterizzato da una bassa affinità per il Ca^{2+} : può infatti trasportare anche altri ioni bivalenti come il Ba^{2+} , il Sr^{2+} , il Mn^{2+} ed è definito MCU (mitochondrial calcium uniporter) (Kirichok et al., 2004). Nonostante la bassa affinità dell'uniporto per il Ca^{2+} , i mitocondri possono accumulare lo ione nella matrice cellulare molto rapidamente e a elevate concentrazioni grazie alla presenza di microdominii ad elevata concentrazione di Ca^{2+} che si generano in seguito alla apertura dei canali per il Ca^{2+} sia della membrana plasmatica che dei depositi intracellulari (Rizzuto et al., 1993). È stato anche dimostrato che VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), un canale anionico non selettivo che regola la permeabilità della membrana mitocondriale esterna (Shoshan-Barmatz et al., 2004) facilita l'accumulo di Ca^{2+} mitocondriale in quanto partecipa alla formazione dei siti di contatto tra mitocondri e canali InsP3 di rilascio del Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico (Szabadkai et al., 2006). Per quanto riguarda le vie di efflusso del Ca^{2+} dal mitocondrio, l'antiporto $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ scambia 2 ioni H^+ con 1 ione Ca^{2+} (Bernardi and Azzone, 1983) e l'antiporto $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ estrude 1 ione Ca^{2+} in scambio con 2 ioni Na^+ (Carafoli et al., 1974).

Nonostante la caratterizzazione biochimica e fisiologica dell'attività dei sistemi di trasporto mitocondriale sia stata oggetto di studio per oltre 50 anni, l'identità molecolare delle proteine deputate al trasporto dello ione dentro e fuori dal mitocondrio è stata solo recentemente rivelata. Per quanto riguarda l'antiporto $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ il gruppo di Sekler e colleghi ha dimostrato che esso è rappresentato dall'unico membro presente nei mammiferi appartenente alla superfamiglia di scambiatori $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ di origine filogeneticamente ancestrale, in cui acronimo NCLX indica che esso è in grado di catalizzare anche il trasporto di Ca^{2+} mediato da ioni Li^+ e non solo da Na^+ (Palty et al., 2010). L'identificazione dell'uniporto è stata invece preceduta dall'identificazione di una proteina nota come MICU1, in grado di modularne l'attività (Perocchi et al., 2010). Successivamente due gruppi indipendenti, utilizzando un approccio in silico basato sull'analisi di un compendio di tutte le proteine mitocondriali (MitoCarta), hanno identificato anche l'MCU (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011). Si tratta di una proteina di 40 kDa, che possiede due domini transmembrana separati da un dominio centrale che contiene residui acidi e che rappresenta la regione deputata alla formazione del poro. Studi di elettrofisiologia condotti sull'MCU purificato e ricostruito in membrane planari ne hanno caratterizzato le proprietà di canale ed hanno dimostrato che possiede le stesse caratteristiche precedentemente descritte per l'uniporto (De Stefani et al., 2011). I due gruppi propongono due modelli alternativi per quanto riguarda la topologia dell'MCU sulla membrana mitocondriale interna: uno propone che le estremità N e C-terminale sporgano nello spazio intermembrana (De Stefani et al., 2011) e l'altro che invece

sporgano nella matrice mitocondriale (Baughman et al., 2011). In entrambi i casi è stato però proposto che l'MCU sia rappresentato da una struttura tetramerica.

Un altro sistema di trasporto che partecipa alla regolazione dei flussi di Ca^{2+} nei mitocondri è rappresentato dal canale PTP (permeability transition pore). E' un canale ad alta conduttanza non selettivo, la cui identità molecolare non è ancora stata definita (Di Lisa and Bernardi, 2005). L'apertura di questo canale, che normalmente è chiuso, causa disaccoppiamento della catena respiratoria con caduta del gradiente elettrochimico e cessazione della sintesi di ATP. Un'apertura prolungata di questo canale causa alterazioni morfologiche dei mitocondri come il rigonfiamento osmotico e il rimodellamento delle "cristae" fino alla rottura della membrana mitocondriale esterna (Ricchelli et al., 2011) con conseguente rilascio di proteine pro-apoptotiche nel citoplasma, tra le quali il citocromo c (Szalai et al., 1999).

La regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} è importante per il controllo di alcuni processi mitocondriali, in particolare il metabolismo energetico. Infatti, l'attività di tre deidrogenasi del ciclo di Krebs (piruvato deidrogenasi, isocitrato deidrogenasi, α -chetoglutarato deidrogenasi) è modulata dalla concentrazione di Ca^{2+} intramitocondriale (Denton and McCormack, 1985): la piruvato deidrogenasi è attivata da una defosforilazione Ca^{2+} dipendente, e gli altri due enzimi, invece sono regolati tramite un legame diretto del Ca^{2+} al complesso enzimatico (Denton and McCormack, 1990). E' stata quindi dimostrata una correlazione diretta tra l'entità degli aumenti della concentrazione di Ca^{2+} nei mitocondri e la produzione di ATP (Jouaville et al., 1999). Oltre all'attivazione delle deidrogenasi mitocondriali, gli aumenti della concentrazione di Ca^{2+} in prossimità dei mitocondri regolano anche la disponibilità dei substrati ossidabili: è stato dimostrato, infatti, che il trasportatore aspartato/glutammato mitocondriale è attivato da Ca^{2+} (Lasorsa et al., 2003).

1.5 La produzione di ATP a livello mitocondriale

L'ATP, adenosina trifosfato, è principalmente prodotto a livello mitocondriale nel processo che prende il nome di fosforilazione ossidativa. La produzione di ATP è finemente regolata tramite un meccanismo a feedback negativo: l'aumento del rapporto ADP/ATP è indice di aumentate richieste energetiche da parte della cellula e si traduce nella stimolazione del processo fosforilazione ossidativa. La produzione di ATP tramite processi di fosforilazione ossidativa prevede che gli elettroni dagli equivalenti riducenti NADH e FADH₂ prodotti nei processi di glicolisi, ciclo di Krebs e ossidazione degli acidi grassi, vengano trasportati attraverso i complessi della catena

respiratoria mitocondriale all'accettore finale rappresentato dall'ossigeno molecolare che viene ridotto ad acqua, ed i protoni generati vengono pompato nello spazio intermembrana. Il gradiente di protoni che si crea durante questo processo è una fonte di energia libera, che viene dissipata quando i protoni dallo spazio intermembrana rientrano nella matrice mitocondriale attraverso il complesso dell'ATP-sintasi. In questo processo, l'ADP viene fosforilato e si forma ATP (Mitchell, 1972). Il trasporto ADP/ATP attraverso la membrana mitocondriale è regolato da uno specifico trasportatore che lavora come antiporto (Traba et al., 2011).

I complessi multienzimatici responsabili del trasporto degli elettroni sono:

- *Complesso I (NADH deidrogenasi o NADH ubiquinone ossidoreduttasi)*: contiene almeno 42 diversi polipeptidi, una flavoproteina e almeno 6 centri ferro-zolfo (questi attraverso modificazioni dello stato di ossidazione del ferro, trasferiscono un elettrone alla volta) e riceve elettroni dal NADH. Questo complesso presenta al microscopio elettronico una forma ad L (Grigorieff, 1999) con un braccio orientato verso la matrice e l'altro immerso nella membrana mitocondriale interna. Per ogni coppia di elettroni fatta passare vengono trasferiti quattro protoni dalla matrice allo spazio intermembrana.
- *Complesso II (Succinato deidrogenasi)*: è costituito da quattro subunità proteiche e da tre centri ferro-zolfo; consente il trasferimento di elettroni dal FADH₂ all'ubichinone, il quale è un benzochinone idrofobico che funziona da trasportatore di elettroni dal complesso II al complesso III. Questo complesso non permette il passaggio di protoni.
- *Complesso III (Citocromo c ossidoreduttasi)*: è un dimero costituito da due monomeri identici, ognuno con 11 subunità polipeptidiche diverse, il citocromo b, due gruppi eme, una proteina ferro-zolfo e il citocromo c. Permette il passaggio di elettroni dall'ubichinone ridotto al citocromo c e per ogni coppia di elettroni, trasferisce quattro protoni.
- *Complesso IV (Citocromo c ossidasi)*: contiene almeno 13 polipeptidi, permette il trasferimento di elettroni dal citocromo c all'ossigeno molecolare riducendolo ad acqua. Permette anche lo spostamento dei protoni. Vengono trasferiti quattro elettroni e, durante il passaggio, quattro protoni vengono prelevati dalla matrice mitocondriale per convertire l'ossigeno in due molecole d'acqua.

Il trasferimento di elettroni attraverso questi complessi, permette di trasferire i protoni fuori dalla matrice mitocondriale; in particolare per ogni coppia di elettroni trasferiti all'ossigeno, vengono pompato dalla matrice allo spazio intermembrana quattro protoni dal complesso I, altri quattro dal complesso III e due dal complesso IV. L'energia elettrochimica che deriva dalla differenza di concentrazione protonica tra la matrice e lo spazio intermembrana e la differenza di cariche attraverso la membrana mitocondriale interna (definita forza motrice protonica), permette la sintesi di ATP quando i protoni invertono la loro direzione e passano attraverso la membrana interna, in un

processo di diffusione facilitata, tramite l'enzima ATP sintetasi che ottiene così l'energia sufficiente per produrre molecole di ATP, trasferendo un gruppo fosfato all'ADP.

1.6 L'Omeostasi dello ione Calcio e il morbo di Parkinson

Il Ca^{2+} a livello neuronale è fondamentale per favorire l'esocitosi dei neurotrasmettitori dalle vescicole di trasporto a livello delle sinapsi. Infatti, nelle terminazioni distali dell'assone, sono presenti dei canali per il Ca^{2+} voltaggio dipendenti che sono di norma chiusi. Quando l'onda di depolarizzazione raggiunge la terminazione nervosa, i canali si aprono e il Ca^{2+} entra nell'ambiente intracellulare. Il Ca^{2+} si comporta come secondo messaggero e innesca la fusione delle vescicole di neurotrasmettitore con la membrana plasmatica. Il neurotrasmettitore rilasciato si lega poi al suo specifico recettore e determina a sua volta una depolarizzazione permettendo così la trasmissione del messaggio a un altro neurone. E' quindi evidente che un'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} può portare a disfunzioni nella trasmissione dei segnali e a processi neurodegenerativi. La morte dei neuroni dopaminergici a livello della substantia nigra caratteristica del morbo di Parkinson sembra essere collegata a una particolare vulnerabilità di questi neuroni in seguito ad alterazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} . I neuroni dopaminergici, a differenza di altri neuroni, presentano un'attività "pacemaking" che li rende attivi e in grado di generare potenziali di azione anche in assenza di un impulso sinaptico. Quest'attività è essenziale per mantenere i necessari livelli di dopamina nelle regioni innervate da questo tipo di neuroni quali ad esempio lo striato (Romo and Schultz, 1990). I canali per il Ca^{2+} voltaggio dipendenti di questi neuroni (di tipo L) sono quindi nello stato aperto per la maggior parte del tempo, e l'ingresso di Ca^{2+} è maggiore rispetto agli altri tipi di neuroni. Questa caratteristica richiede un costo metabolico elevato alla cellula, ed, oltre all'attività dei sistemi di rimozione del Ca^{2+} della membrana plasmatica (PMCA e NCX), anche il contributo degli organelli intracellulari, quali il reticolo endoplasmatico e i mitocondri, risulta di fondamentale importanza (Chan et al., 2009). Appare quindi evidente che difetti della funzionalità mitocondriale associati al morbo di Parkinson possano rendere i neuroni dopaminergici più suscettibili a insulti neurotossici ed accelerare così il loro invecchiamento innescando il processo neurodegenerativo. E' quindi chiaro che i mitocondri, sia come regolatori sia come bersaglio della regolazione del segnale Ca^{2+} , giocano un ruolo essenziale nella patologia, ciò è avvalorato dalla scoperta delle proteine coinvolte nelle forme familiari di Parkinson, le quali, pur avendo una diversa funzione biologica e, in alcuni casi, una diversa localizzazione cellulare, sembrano condividere vie di segnalazione comuni che coinvolgono il suddetto organello. Per quanto riguarda invece il loro possibile coinvolgimento nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} e in particolare dell'omeostasi dello

ione nel mitocondrio, i dati disponibili in letteratura sono ancora scarsi, come illustrato nella descrizione delle singole proteine al paragrafo 1.2 di questa tesi.

2. RISULTATI

Il primo approccio sperimentale che è stato utilizzato in questa tesi per caratterizzare il possibile coinvolgimento delle proteine associate a forme familiari di MP nel controllo dell'omeostasi di Ca^{2+} , ed in particolare di quella mitocondriale, si è basato sulla loro sovraespressione in cellule modello semplici di origine non neuronale, le cellule HeLa, e lo studio degli effetti provocati a livello cellulare. Si è poi proceduto con esperimenti di silenziamento genico per verificare se la perdita di funzione di una specifica proteina fosse effettivamente responsabile del fenotipo osservato. Alcuni aspetti sono stati analizzati anche utilizzando un modello cellulare di origine neuronale, le cellule di neuroblastoma umano SH-SY 5Y. Dal punto di vista sperimentale si è proceduto in parallelo analizzando gli stessi parametri per tutte le proteine, tuttavia i risultati verranno esposti prendendo in considerazione prima i dati ottenuti per α -sin, parkina e DJ-1 e poi, separatamente, quelli ottenuti analizzando gli effetti della proteina PINK1, in quanto questi ultimi sono risultati più complessi e di difficile interpretazione.

2.1 Analisi degli effetti della sovraespressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1 sulle funzioni mitocondriali

Uno degli approcci sperimentali utili alla caratterizzazione dell'attività di una determinata proteina consiste nel modificarne i suoi livelli intracellulari e nell'analizzare gli effetti di tali modifiche su parametri cellulari diversi in cellule intatte, preservando così l'ambiente fisiologico nel quale le proteine d'interesse svolgono la propria funzione.

Secondo quest'approccio abbiamo deciso di studiare se le proteine le cui mutazioni sono responsabili dell'insorgenza di forme familiari di MP potessero avere un ruolo nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale e le abbiamo quindi sovraesprese in sistemi cellulari modello semplici. Questo tipo di strategia, in questo caso specifico, risulta di particolare rilevanza in quanto, nonostante siano stati prodotti numerosi modelli animali per il MP, nessuno di questi è in grado di ricapitolare completamente i segni clinici della malattia umana, lasciando quindi molti punti di domanda su quale sia l'esatto ruolo fisiologico delle proteine mutate. Uno studio a livello cellulare per comprendere a fondo il ruolo delle proteine le cui mutazioni sono coinvolte nelle forme genetiche di MP appare quindi di notevole importanza.

2.1.1 Analisi dei livelli di espressione di α -sin, parkina e DJ-1 in cellule HeLa e SH-SY 5Y.

Le proteine α -sin, parkina e DJ-1 sono state sovraesprese in cellule HeLa, e la loro distribuzione intracellulare è stata analizzata utilizzando anticorpi primari specifici e mediante un'analisi immunocitochimica. Com'è possibile vedere dalle immagini della Figura 1A tutte e tre le proteine presentano una distribuzione citosolica, senza esclusione nucleare. In seguito è stata effettuata un'analisi per Western blot per analizzarne i livelli di sovraespressione. La Figura 1B mostra che, nelle cellule HeLa, α -sin e DJ-1 sono espresse in maniera endogena, mentre parkina è assente, in accordo con quanto precedentemente riportato in letteratura. I livelli di espressione di α -sin e DJ-1 sono stati quantificati per analisi densitometrica dell'intensità delle bande ottenute (dati non mostrati) e, in entrambi i casi, si è osservato un aumento pari al 50% rispetto al livello di proteina endogena. Considerato che l'efficienza di transfezione secondo il protocollo del Ca/P utilizzato è pari al 25% possiamo calcolare che nelle cellule positive l'aumento dei livelli di α -sin e di DJ-1 è pari a circa di tre volte il contenuto delle proteine endogene.

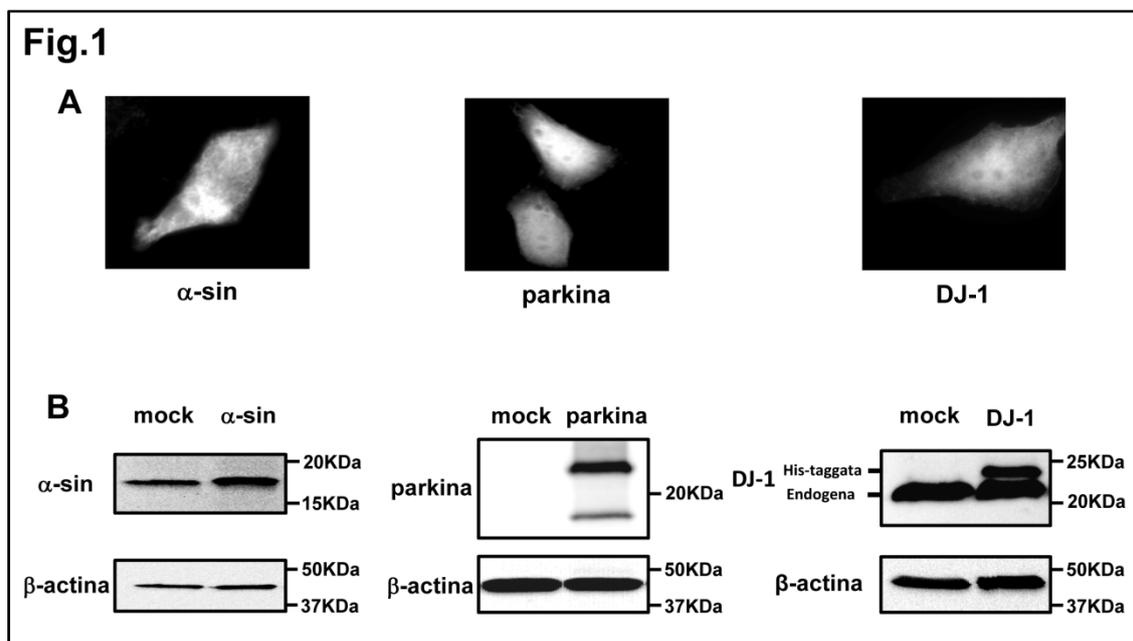


Figura 1

Immunolocalizzazione e Western blot in cellule HeLa sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1, e analizzate mediante immunocitochimica (A) o Western blot (B).

Per verificare che la distribuzione cellulare non dipendesse dal tipo cellulare utilizzato e per avere poi un altro modello su cui condurre le misure della concentrazione di Ca^{2+} abbiamo deciso di utilizzare anche le cellule di neuroblastoma umano (SH-SY 5Y), una linea neuronale

dopaminergica. La Figura 2A mostra l'analisi d'immunocitochimica ed è evidente come anche in queste cellule le tre proteine vengano espresse a livello citosolico. A differenza che nelle HeLa non è però possibile apprezzare i livelli endogeni di proteina, come mostrato nel Western blot di Figura 2B.

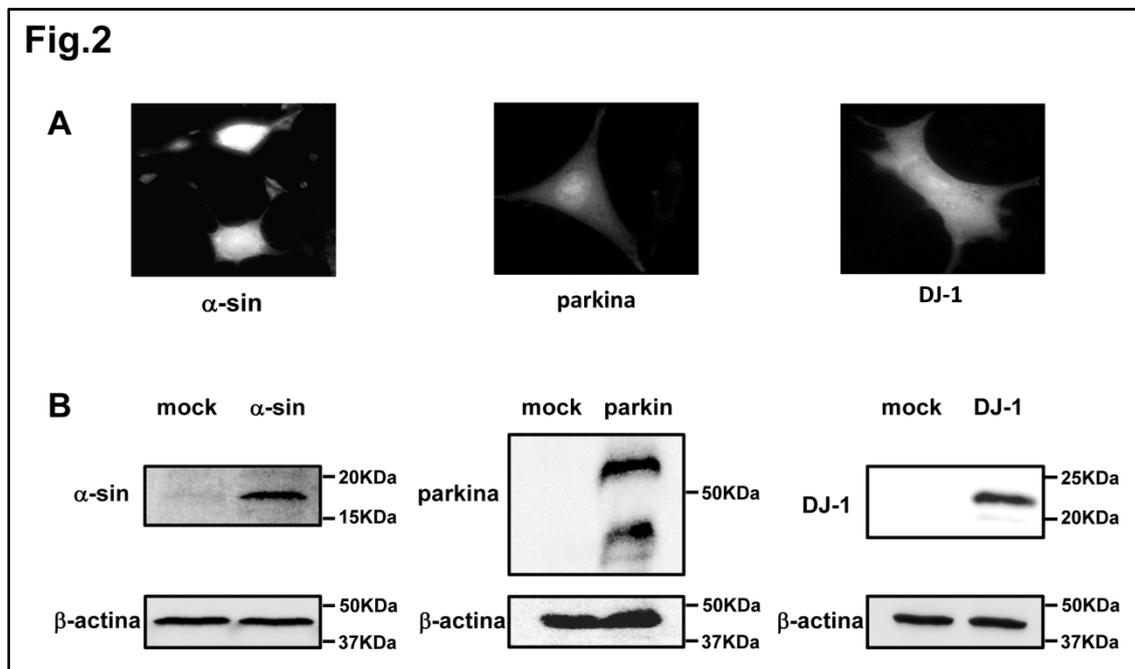


Figura 2

Immunolocalizzazione e Western blot in cellule SH-SY 5Y sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule SH-SY 5Y sono state transfettate con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1, e analizzate mediante immunocitochimica (A) o Western blot (B).

2.1.2 Misura dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale generati in seguito alla stimolazione di cellule modello che sovraesprimono α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule HeLa o le cellule SH-SY5Y sono state co-transfettate con la sonda ricombinante Ca^{2+} -sensibile equorina indirizzata alla matrice mitocondriale (mtAEQ) (Martins et al., 2004) e la proteina di interesse come indicato in Figura 3 ed in Figura 4. Le cellule sono state stimolate con l'opportuno agonista (istamina nel caso delle cellule HeLa, e bradichinina nel caso delle cellule SH-SY 5Y) per i recettori della membrana plasmatica accoppiati a proteine G e alla generazione del secondo messaggero InsP3, che a sua volta induce il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari ed il conseguente ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare. Come mostrato in Figura 3 e 4, in tutti e due i tipi cellulari, la sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1 induce un aumento significativo di

circa il 20% dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale generati in seguito alla stimolazione cellulare rispetto alle cellule di controllo.

Figura 3

Transienti di Ca^{2+} mitocondriale in cellule HeLa sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con mtAEQ e il plasmide vuoto o con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori di $[\text{Ca}^{2+}]$ dopo stimolazione ($n > 8$). Le tracce sono rappresentative di un singolo esperimento. Dove indicato, le cellule sono state perfuse con $100\mu\text{M}$ istamina (agonista per l'attivazione del segnale InsP3).

Fig.3

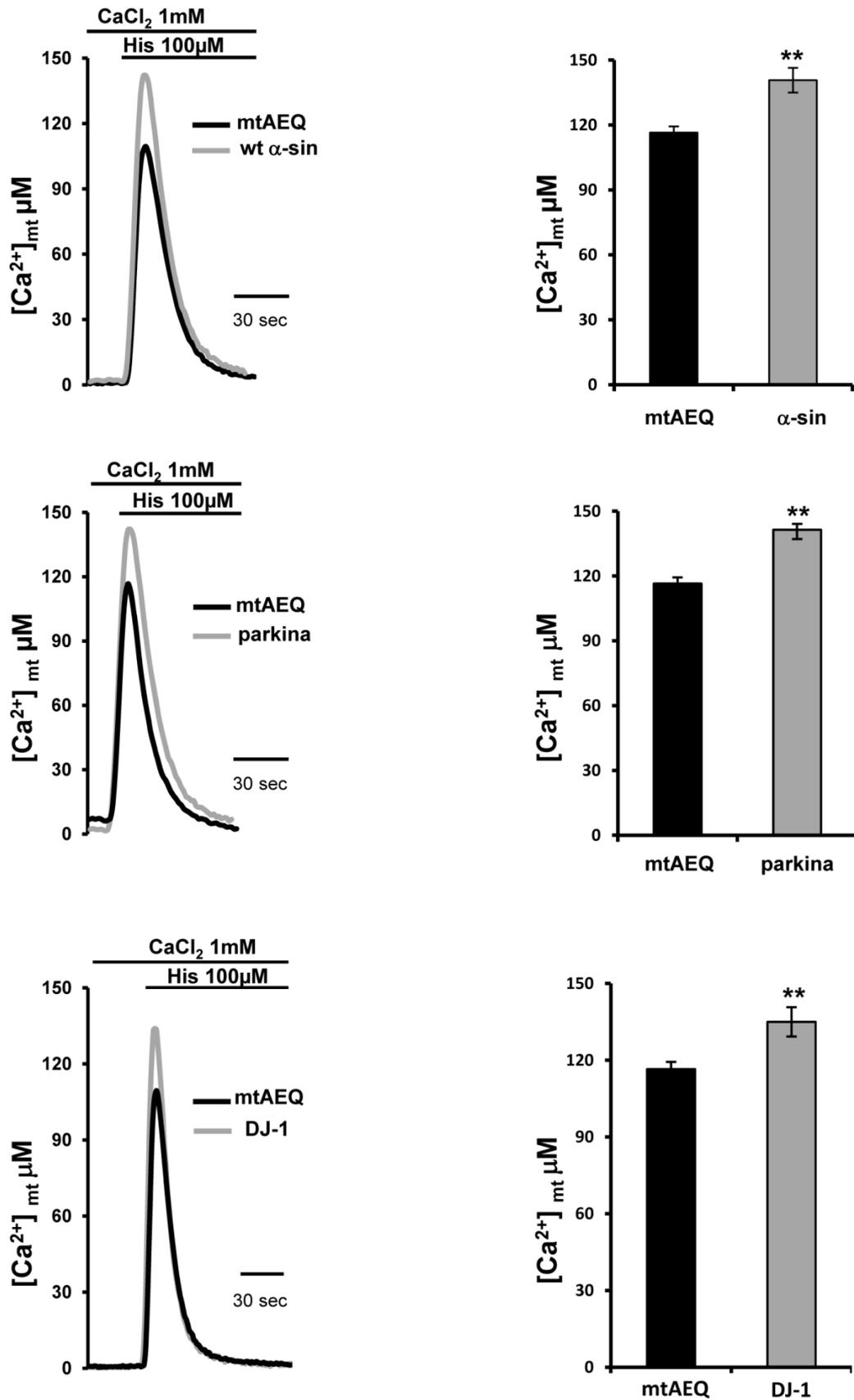


Fig.4

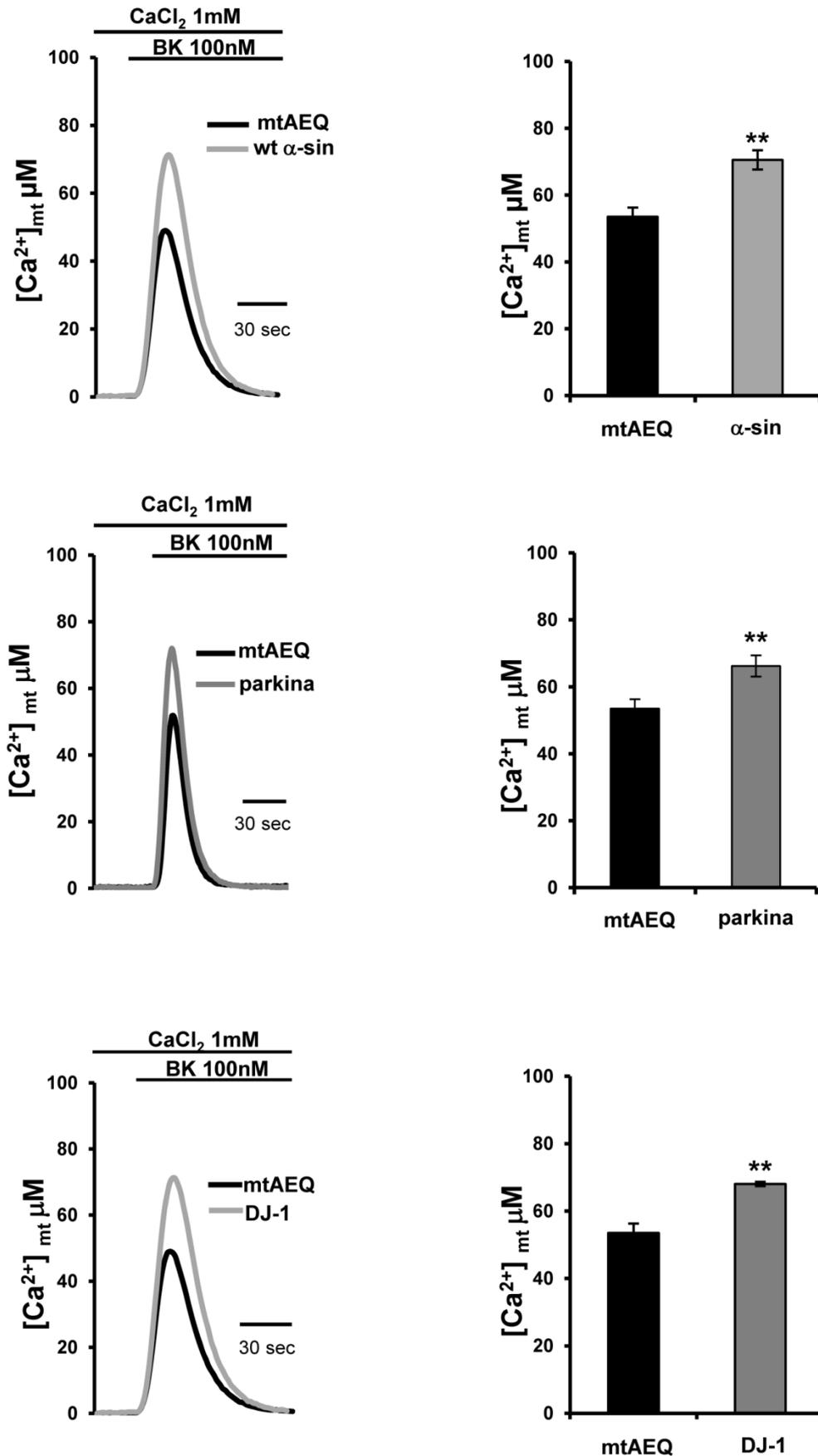


Figura 4

Transienti di Ca^{2+} mitocondriali in cellule SH-SY 5Y sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule SH-SY 5Y sono state transfettate con mtAEQ e il plasmide vuoto o con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori di $[\text{Ca}^{2+}]$ dopo stimolazione ($n > 8$). Le tracce sono rappresentative di un singolo esperimento. Dove indicato, le cellule sono state perfuse con 100nM bradichinina (agonista per l'attivazione del segnale InsP3).

2.1.3 Analisi della morfologia mitocondriale in cellule HeLa che sovraesprimono α -sin, parkina e DJ-1.

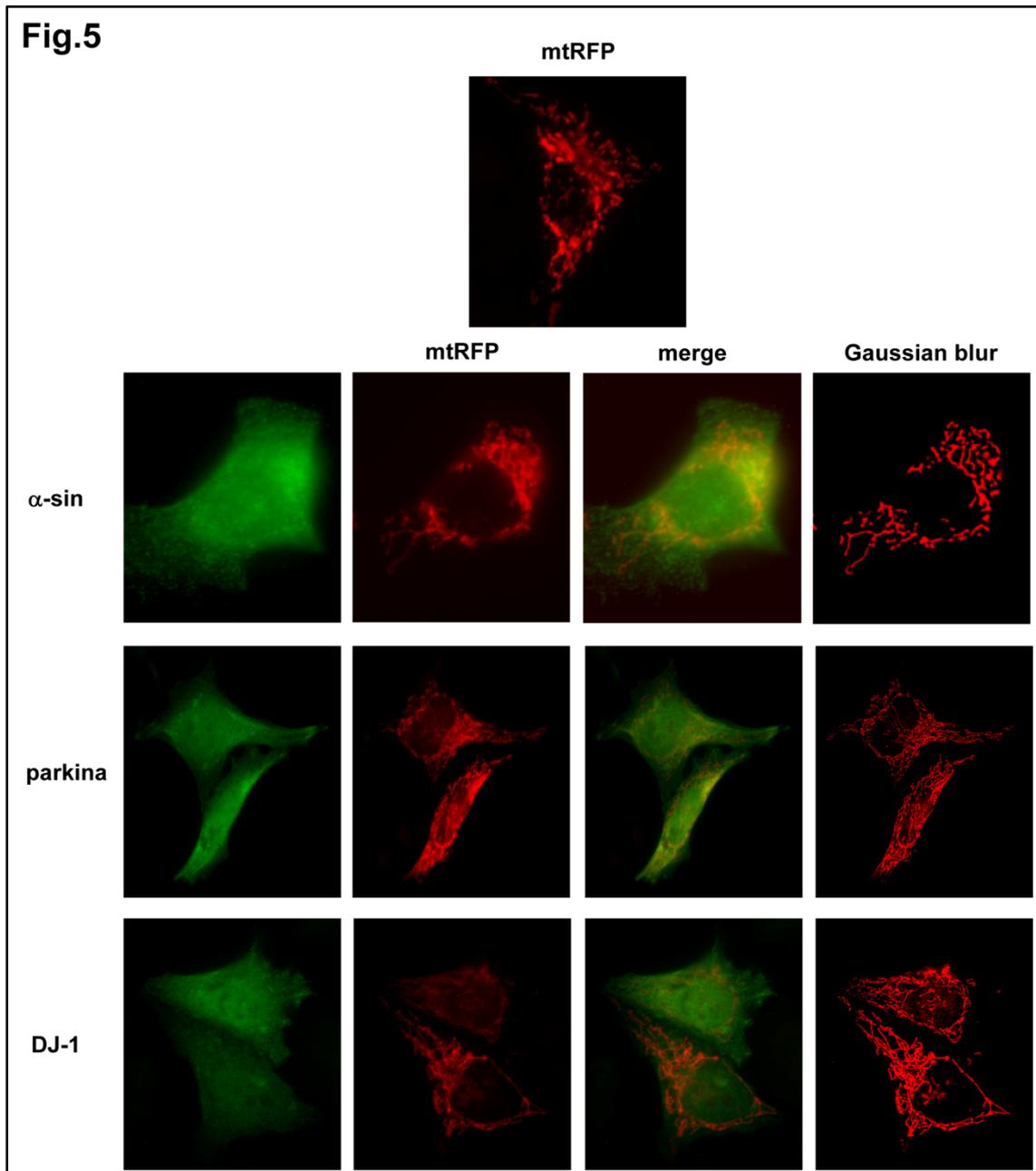
Considerati i dati presenti in letteratura sugli effetti della sovraespressione di α -sin e del silenziamento di DJ-1 e parkina sulla morfologia mitocondriale, abbiamo voluto verificare se la loro sovraespressione nei nostri modelli cellulari avesse qualche effetto. Per visualizzare i mitocondri abbiamo co-transfettato i plasmidi che esprimono le proteine d'interesse con un plasmide che codifica una proteina fluorescente rossa indirizzata alla matrice mitocondriale (mtRFP). Come si può osservare in Figura 5, l'analisi immunocitochimica delle cellule co-transfettate mostra come nessuna delle tre proteine sembra in grado di modificare la morfologia dei mitocondri nelle cellule HeLa, che appaiono filamentosi e con un aspetto reticolare simile a quello delle cellule di controllo. Si può anche notare come nessuna delle tre proteine presenti co-localizzazione mitocondriale. Le immagini mostrate nei pannelli indicati con "Gaussian blur" sono state ottenute con un apposito software di analisi d'immagine e mostrano in maniera più definita lo stato del "network" mitocondriale. I dati ottenuti in seguito alla sovraespressione di α -sin sono in disaccordo con alcuni dati recentemente apparsi in letteratura e che riportano che la sovraespressione di α -sin possa indurre frammentazione mitocondriale. Tale discrepanza è probabilmente dovuta ai livelli di espressione, che nel nostro caso, sono relativamente bassi e non tossici per la cellula, e quindi non danneggiano i mitocondri. A dimostrazione di ciò, la sovraespressione di α -sin ottenuta utilizzando un protocollo di transfezione che prevede l'uso di lipidi cationici (LipoFectamine 2000, Invitrogen) in grado di aumentare di molto i livelli d'espressione, induce frammentazione del network mitocondriale (dati non mostrati). Al fine di garantire il mantenimento di condizioni il più vicino possibile alle condizioni fisiologiche, abbiamo deciso quindi di procedere con le analisi successive utilizzando le cellule HeLa, con le quali è possibile sfruttare efficacemente la tecnica del Ca/P per la transfezione.

Figura 5

Cellule HeLa cotransfettate con red fluorescent protein targettata ai mitocondri (mtRFP) e il plasmide vuoto o con α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con mtRFP e il plasmide vuoto o con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1 e successivamente sottoposte ad analisi di immunocitochimica. Le figure "merge" non rivelano colocalizzazione tra le proteine e i mitocondri. L'analisi Gaussian Blur è stata eseguita

mediante il software ImageJ per rimuovere il segnale fuori fuoco. La fluorescenza dell'mtRFP rivela che i mitocondri risultano avere una morfologia filamentosa e fisiologica sia nelle cellule di controllo che in quelle transfettate con le proteine di nostro interesse.



2.1.4 Analisi dei livelli di Ca^{2+} nel citoplasma e nel reticolo endoplasmatico (RE) in cellule HeLa che sovraesprimono α -sin, parkina e DJ-1.

Per comprendere in che modo le tre proteine prese in esame possano agire sull'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale, ne abbiamo analizzato gli effetti sui livelli di questo ione in altri compartimenti della

cellula. In seguito alla generazione di InsP3 i livelli di Ca^{2+} citosolici aumentano a causa del rilascio dai depositi intracellulari (di cui il RE è il principale) e dell'entrata dello stesso dall'ambiente extracellulare attraverso i canali della membrana plasmatica attivati dallo svuotamento dei depositi. Come illustrato nell'introduzione l'ingresso di Ca^{2+} nei mitocondri attraverso l'MCU dipende dall'entità dei microdominii che si generano in prossimità dei canali del Ca^{2+} e nelle cellule HeLa in particolare modo dalla presenza di siti di contatto tra mitocondri e RE (Rizzuto et al., 1993). L'entità dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale dipende quindi oltre che dalla capacità di trasporto del MCU secondo gradiente di potenziale anche dalla quantità di Ca^{2+} rilasciato. La Figura 6 mostra la misura di Ca^{2+} citosolico in cellule HeLa co-transfettate con la sonda equorina citosolica (cytAEQ) e la proteina di interesse. La sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1 non modifica i transienti Ca^{2+} citosolici ottenuti in seguito a stimolazione cellulare. Per quanto riguarda la misura della concentrazione di Ca^{2+} del RE è stata invece utilizzata una sonda indirizzata al lume del reticolo (erAEQ) e come si può notare in Figura 7 anche per quanto riguarda questo compartimento cellulare non sono state osservate differenze nelle cellule che sovraesprimono le proteine di interesse rispetto alle cellule di controllo.

Figura 6

Transienti di Ca^{2+} citosolici in cellule HeLa sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con cytAEQ e il plasmide vuoto o con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori di $[\text{Ca}^{2+}]$ dopo stimolazione ($n > 14$). Le tracce sono rappresentative di un singolo esperimento. Dove indicato, le cellule sono state perfuse con $100\mu\text{M}$ istamina (agonista per l'attivazione del segnale InsP3).

Fig.6

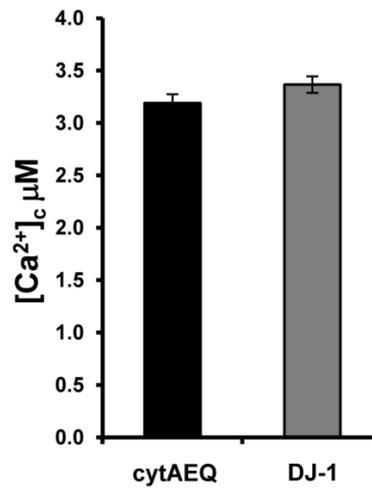
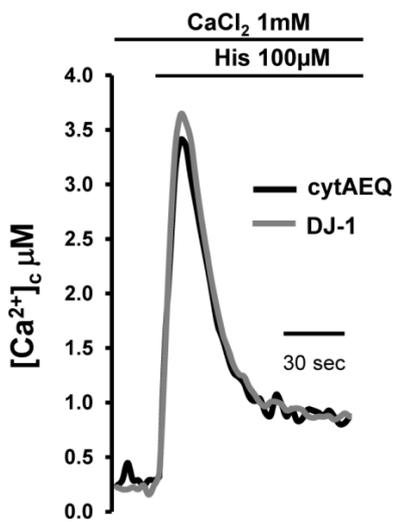
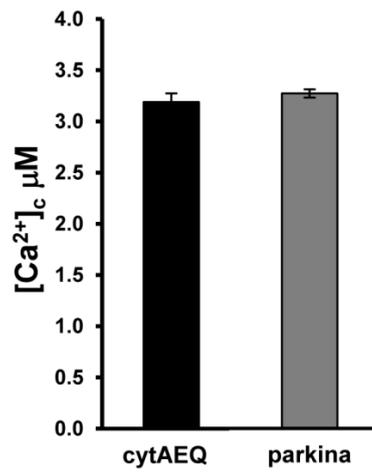
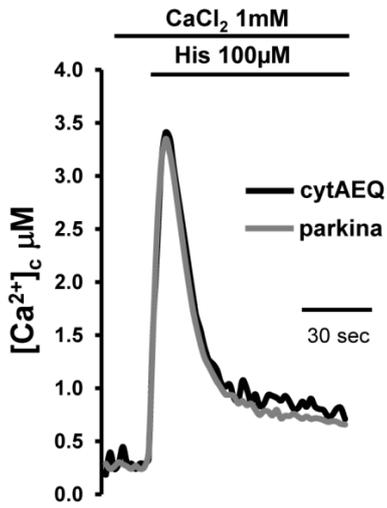
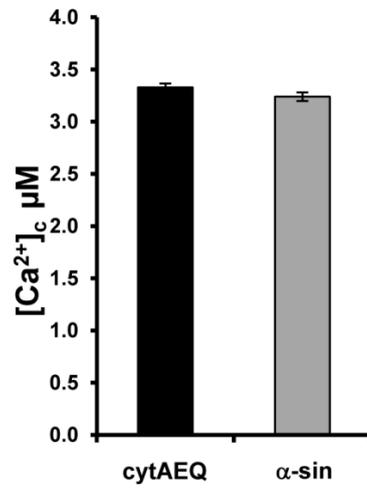
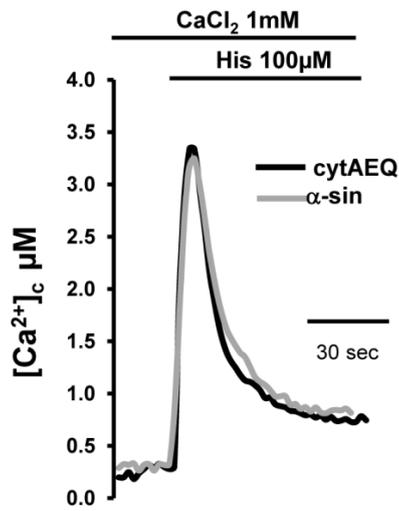


Fig.7

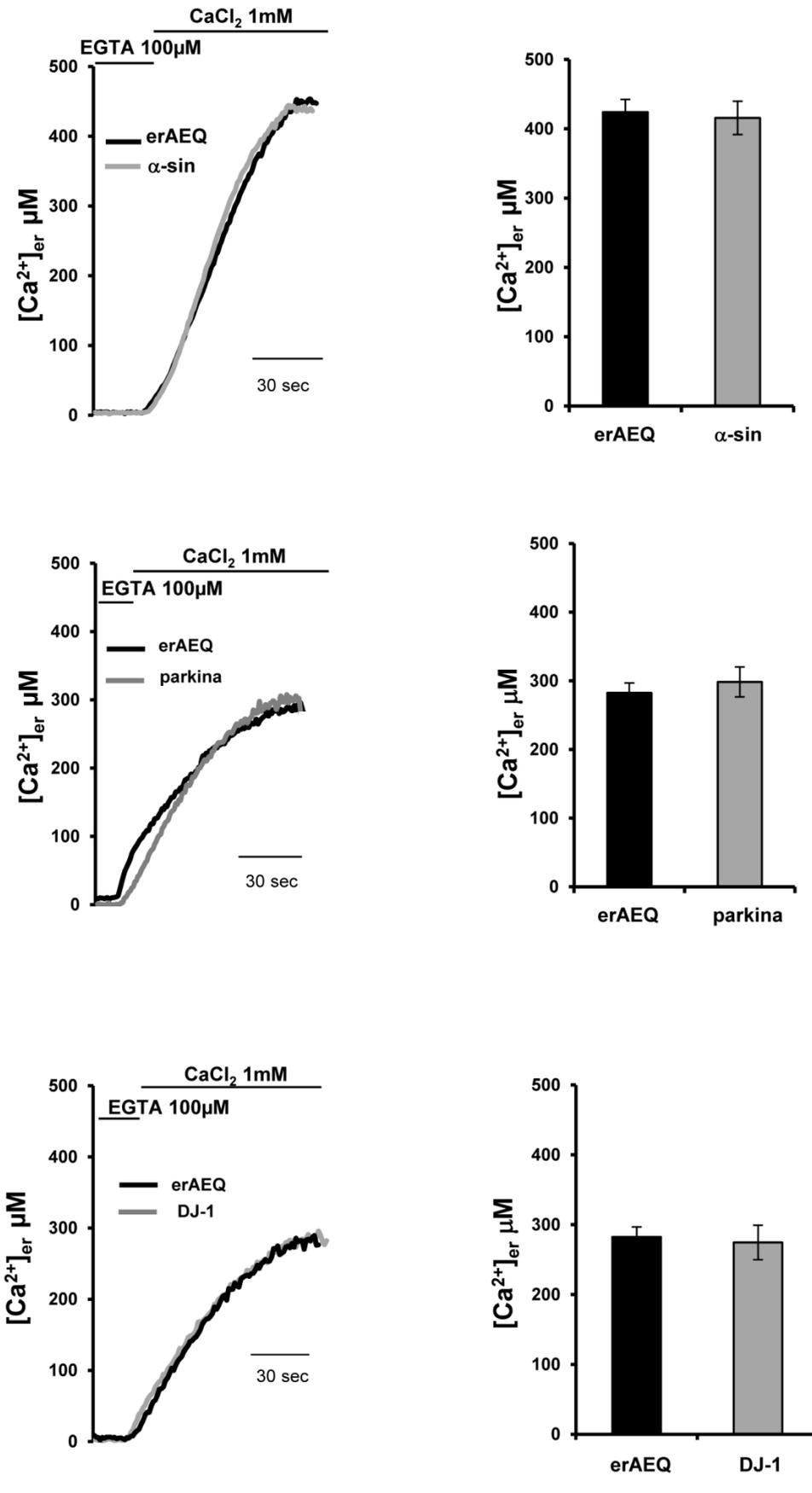


Figura 7

Concentrazione di Ca^{2+} nel RE in cellule HeLa sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1.

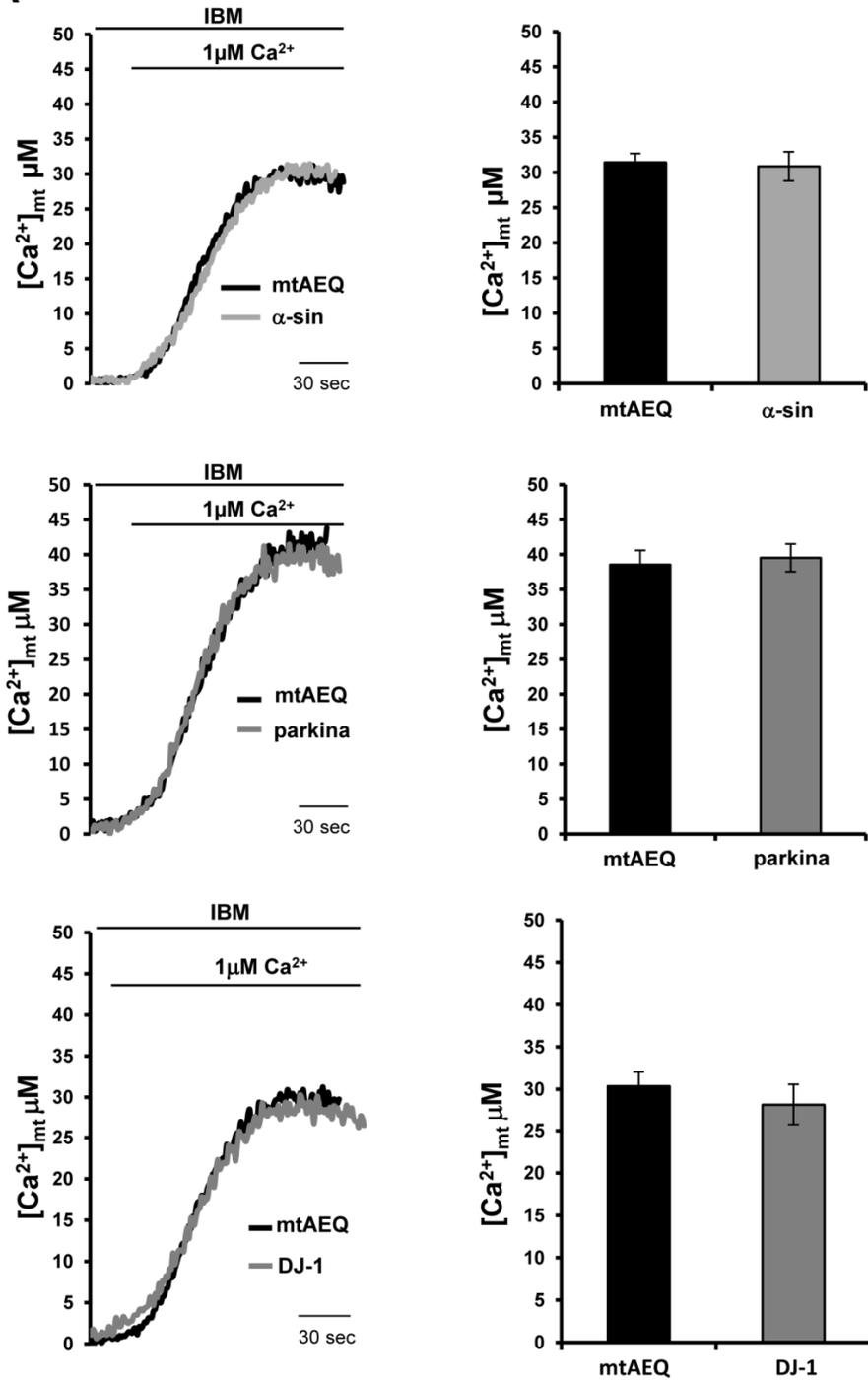
La figura mostra la cinetica di riempimento del RE dopo l'aggiunta di CaCl_2 1mM in cellule HeLa svuotate dal Ca^{2+} . Le cellule sono state transfettate con erAEQ e il plasmide vuoto o con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori di $[\text{Ca}^{2+}]$ dopo il riempimento ($n > 10$). Le tracce sono rappresentative di un singolo esperimento. Dove indicato, le cellule sono state perfuse con 1mM CaCl_2 .

2.1.5 Analisi degli effetti della sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1 sulla capacità dei mitocondri di accumulare Ca^{2+} in cellule permeabilizzate ed esposte a una concentrazione fissa di Ca^{2+} .

L'assenza di effetti della sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1 sui transienti di Ca^{2+} citosolico e sul contenuto di Ca^{2+} nel RE ci ha suggerito di indagare se le differenze osservate a livello mitocondriale potessero dipendere dall'azione delle tre proteine sui trasportatori che partecipano alla regolazione del Ca^{2+} mitocondriale, quali l'uniporco (per quanto riguarda l'entrata di Ca^{2+} nel mitocondrio) oppure gli scambiatori $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (per quanto riguarda l'uscita dello ione dall'organello). Per testare questa ipotesi abbiamo sovraespresso le nostre tre proteine insieme alla sonda mtAEQ. Le cellule HeLa sono state permeabilizzate con digitonina in assenza di Ca^{2+} e poi perfuse con una soluzione la cui composizione mima il contenuto intracellulare e contenente $1\mu\text{M}$ Ca^{2+} , in modo da imporre al mitocondrio una concentrazione di Ca^{2+} fissa. In queste condizioni la capacità dei mitocondri di accumulare Ca^{2+} è indipendente dall'entità dei microdominii e dipende interamente dai suoi sistemi di trasporto nei mitocondri. In Figura 8A sono mostrate le curve ottenute perfondendo le cellule con una concentrazione di Ca^{2+} pari a $1\mu\text{M}$ ed a fianco sono riportati gli istogrammi dei valori medi dei picchi ottenuti. Nessuna differenza nella cinetica e nella quantità di Ca^{2+} accumulato è stata riscontrata nelle cellule sovraesprimenti le proteine d'interesse rispetto a quelle di controllo, a escludere quindi che le proteine α -sin, parkina e DJ-1 possano influenzare l'attività dei sistemi di trasporto del Ca^{2+} . La Figura 8B mostra la distribuzione cellulare di α -sin, parkina e DJ-1 dopo la permeabilizzazione con digitonina e come si può notare, le proteine sono ancora presenti nel citoplasma delle cellule HeLa, a suggerire che probabilmente non siano completamente solubili ma possano ancorarsi alle membrane intracellulari.

Fig.8

A



B

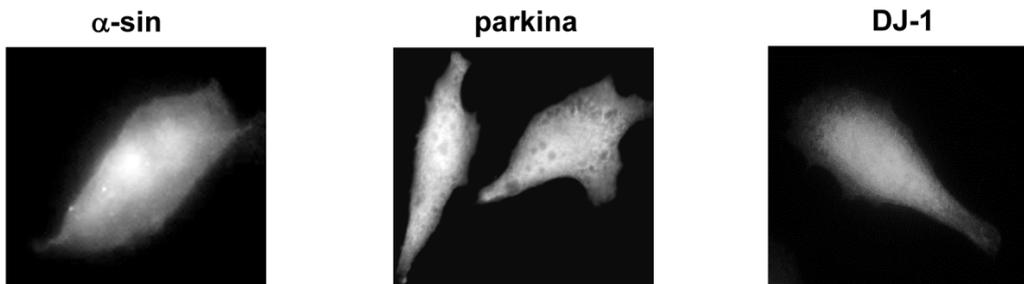


Figura 8

Accumulo di Ca^{2+} e analisi d'immunocitochimica in cellule HeLa permeabilizzate e sovraespressanti α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con mtAEQ e il plasmide vuoto o con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori di $[\text{Ca}^{2+}]$ dopo perfusione con una soluzione contenente $1\mu\text{M}$ di Ca^{2+} tamponato ($n>10$). Le tracce sono rappresentative di un singolo esperimento (A). L'analisi immunocitochimica è stata fatta nelle cellule dopo permeabilizzazione con la medesima soluzione e le medesime tempistiche delle misure di $[\text{Ca}^{2+}]$ (B).

2.1.6 Analisi della differenza di potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) in cellule HeLa sovraespressanti α -sin, parkina e DJ-1.

Il motore che media l'entrata del Ca^{2+} nei mitocondri è dato dal gradiente elettrochimico che s'instaura a livello della membrana mitocondriale interna grazie all'attività della catena respiratoria. Pertanto abbiamo deciso di analizzare se la sovraespressione delle nostre tre proteine potesse in qualche modo modificare il potenziale di membrana mitocondriale, modulando così l'entrata di Ca^{2+} nel mitocondrio. Gli istogrammi riportati in Figura 9 si riferiscono alla differenza dei valori percentuali dei livelli di fluorescenza dell'indicatore tetrametil-rodamina-metil-estere (TMRM) utilizzato per misurare il potenziale di membrana mitocondriale prima e dopo il trattamento delle cellule con il disaccoppiante mitocondriale FCCP che abolisce la differenza di potenziale di membrana. Una riduzione della differenza percentuale ($\Delta\%$) dei valori di fluorescenza è indice di depolarizzazione mitocondriale. Come si può notare la sovraespressione di α -sin e DJ-1 non modifica il potenziale di membrane mitocondriale, mentre l'espressione di parkina lo aumenta leggermente. Questo dato indica che la sovraespressione delle nostre proteine non altera in maniera sostanziale il potenziale di membrana ed anche le differenze osservate nella capacità di accumulare Ca^{2+} non dipendono da variazioni di questo parametro.

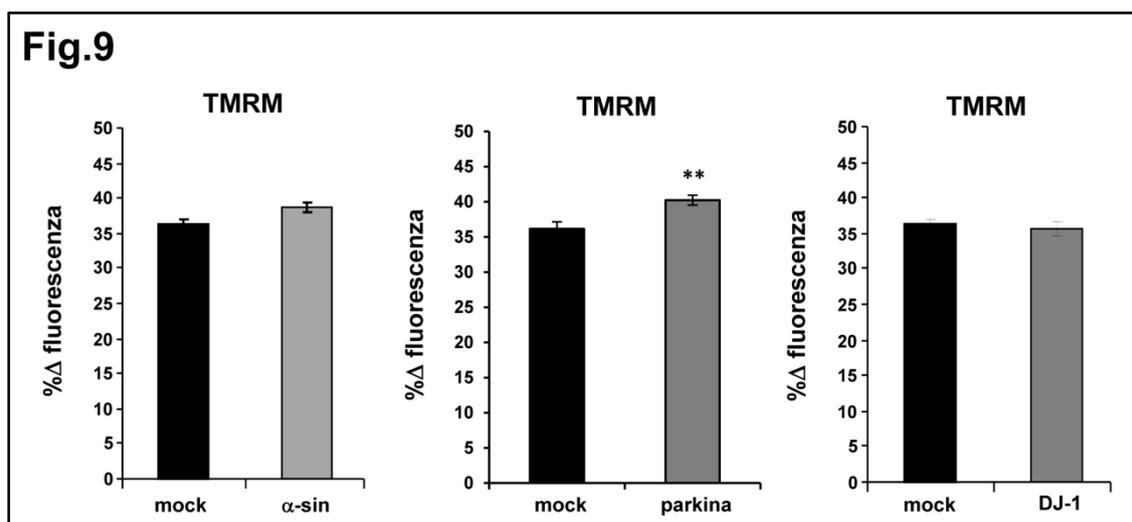


Figura 9

Il potenziale di membrana mitocondriale in cellule HeLa non varia in seguito alla sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con il plasmide esprimente una GFP citosolica e con il plasmide vuoto o con i plasmidi per l'espressione delle proteine α -sin, parkina e DJ-1. In seguito le cellule sono state caricate con la sonda TMRM per determinare il potenziale di membrana mitocondriale. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori di fluorescenza del TMRM, espressa come percentuale, dopo aver sottratto la fluorescenza residua in seguito al trattamento con il disaccoppiante FCCP (n>124 cellule, in 3 diversi esperimenti). Per le misure sono state scelte cellule positive per la GFP (dato non mostrato).

2.1.7 Analisi del contributo del rilascio di Ca^{2+} dal RE e dell'entrata di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare nella generazione dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali.

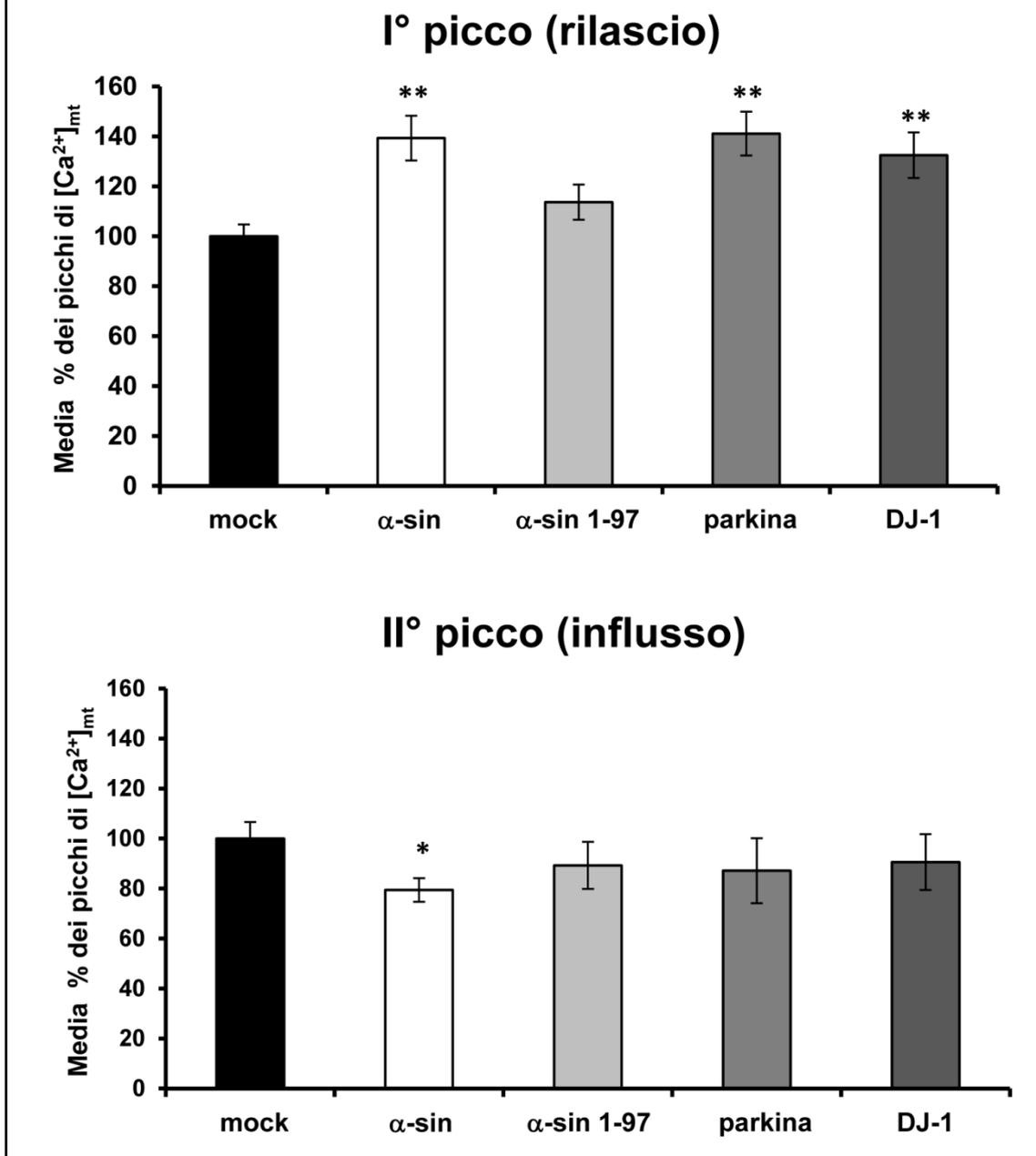
Gli esperimenti presentati fino a questo punto non hanno consentito di stabilire i meccanismi molecolari da cui dipendono gli effetti osservati e non ci hanno permesso di capire in che modo le tre proteine prese in esame possano far aumentare i transienti di Ca^{2+} all'interno del mitocondrio. L'accumulo di Ca^{2+} da parte dei mitocondri dipende dalla $\Delta\psi_m$ (che nel nostro caso non risulta essere sostanzialmente modificata dalla sovraespressione delle proteine di interesse) e dalla generazione di microdominii ad elevata concentrazione di Ca^{2+} in prossimità della "bocca" di apertura dei canali per il Ca^{2+} (che nelle cellule HeLa sono rappresentati soprattutto dai canali-recettori dell'InsP3 del RE) e che vengono "sentiti" dai mitocondri vicini. Nelle cellule, infatti, molti mitocondri risultano essere strettamente connessi al RE e questa vicinanza permette ai mitocondri di essere esposti ad una concentrazione elevata di Ca^{2+} quando il RE si svuota in seguito alla stimolazione con agonisti accoppiati alla generazione di InsP3. E' stato recentemente dimostrato che il trasferimento costitutivo di Ca^{2+} dal RE ai mitocondri mediato dal recettore-canale per l'InsP3 è un elemento essenziale per il mantenimento delle funzioni bioenergetiche della cellula e che se questo viene a mancare viene innescata la morte cellulare per autofagia (Cardenas et al., 2010). Abbiamo quindi ipotizzato che la sovraespressione delle nostre proteine potesse influenzare il trasferimento specifico di Ca^{2+} dal RE ai mitocondri e che eventualmente questo potesse dipendere dalla modulazione della formazione dei siti di contatto tra mitocondri e RE. Per indagare quest'aspetto abbiamo utilizzato la possibilità di separare, applicando un opportuno protocollo sperimentale, il contributo del rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari da quello dell'ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare nella generazione dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale. Gli istogrammi presentati in Figura 10 rappresentano i valori medi dei picchi dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale in cellule HeLa ottenuti in seguito alla stimolazione cellulare in assenza di Ca^{2+} esterno (I picco, rilascio dai depositi) e aggiungendo successivamente Ca^{2+} (II picco, influsso dall'esterno). Com'è possibile vedere, la sovraespressione di tutte e tre le proteine causa un

incremento del primo picco, mentre non ha nessun effetto sul secondo picco per quanto riguarda parkina e DJ-1. La sovraespressione di α -sin invece riduce l'altezza del secondo picco, ad indicare che una riduzione dell'influsso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare si ripercuote anche sull'accumulo di Ca^{2+} dei mitocondri esposti a tali microdominii, in accordo con quanto già descritto precedentemente (Hettiarachchi et al., 2009). Per quanto riguarda α -sin, oltre alla proteina nativa, è stata analizzata anche una forma troncata degli ultimi 43 amminoacidi del suo dominio C-terminale (la variante α -sin 1-97): in questo caso non si è osservato nessun effetto, né sul primo picco né sul secondo picco, ad indicare, come vedremo per gli esperimenti descritti al paragrafo 2.3.3 che tale forma troncata non ha alcun effetto sul controllo delle funzioni mitocondriali. Il dato importante resta comunque che abbiamo ottenuto una prima indicazione che dimostra come α -sin, parkina e DJ-1 abbiano un effetto selettivo sul trasferimento di Ca^{2+} dal RE ai mitocondri.

Figura 10

Analisi del contributo del rilascio di Ca^{2+} dal RE e dell'influsso del Ca^{2+} dallo spazio extracellulare alla concentrazione di Ca^{2+} mitocondriale nelle cellule sovraesprimenti α -sin, α -sin 1-97, parkina, e DJ-1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con la sonda mtAEQ e il plasmide vuoto, o con le proteine di nostro interesse. Per discriminare i due contributi ai transienti di Ca^{2+} mitocondriale, il rilascio di Ca^{2+} InsP3-mediato dai depositi intracellulari è stato separato dall'influsso concomitante attraverso la membrana plasmatica. Le cellule HeLa sono state perfuse in soluzione KRB-glucosio/EGTA 100 μ M e stimulate con istamina 100 μ M per rilasciare Ca^{2+} dai depositi intracellulari (I° picco). In seguito il medium di perfusione è stato cambiato con KRB-glucosio/ Ca^{2+} 2mM (ancora in presenza di istamina) per stimolare l'entrata di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare (II° picco). Gli istogrammi rappresentano la media normalizzata dei transienti di Ca^{2+} misurati (n>13).

Fig.10

2.1.8 Analisi dell'area di contatto tra mitocondri e RE.

Per analizzare se l'aumento dei transienti di Ca^{2+} potesse dipendere da una modulazione dei siti di contatto tra ER e mitocondri abbiamo sovraespresso le proteine di interesse in cellule HeLa insieme alla sonda fluorescente mtRFP per marcare il reticolo mitocondriale e alla sonda fluorescente verde erGFP indirizzata al lume del RE. Le cellule sono state analizzate al microscopio confocale acquisendo una serie d'immagini successive lungo l'asse verticale, in modo da potere poi fare una

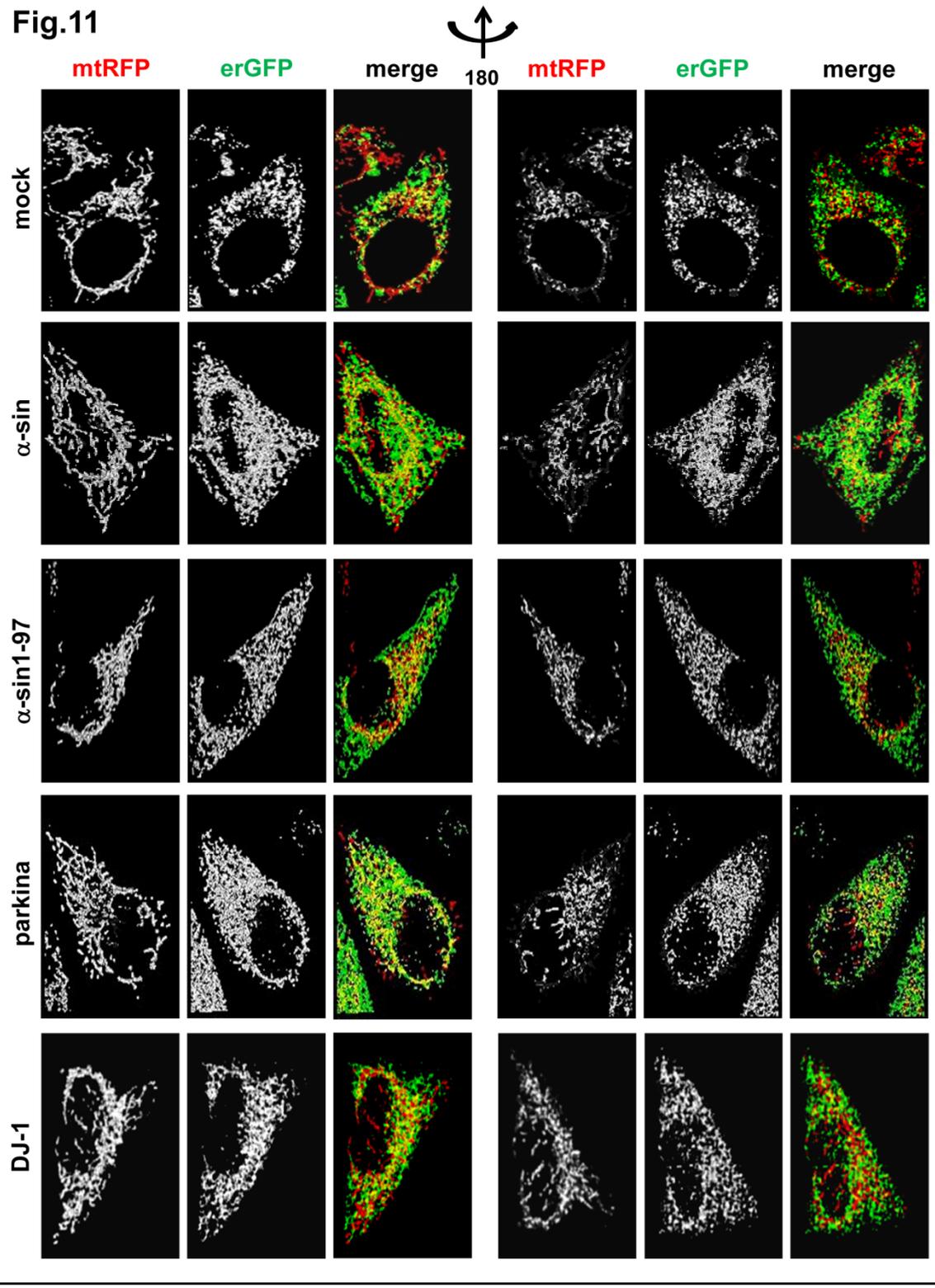
ricostruzione tridimensionale di tutta la cellula (i dettagli sperimentali sono descritti nella sezione Materiali e Metodi). L'entità dei siti di contatto è stata valutata sovrapponendo le immagini dei singoli piani e analizzando la colocalizzazione delle due strutture in base alla comparsa di una fluorescenza gialla, data dalla sovrapposizione del "segnale verde erGFP" con il "segnale rosso mtRFP" (Figura 11). Come si può notare, la sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1 porta a un aumento delle zone di colocalizzazione, che corrispondono ai siti di contatto tra mitocondri e RE. Anche in questo caso, oltre alla forma nativa di α -sin è stata analizzata la variante α -sin 1-97 che non ha mostrato di indurre differenze rispetto alle cellule di controllo.

Per valutare quantitativamente l'entità dei siti di contatto abbiamo utilizzato un software di analisi di immagine che, analizzando la ricostruzione tridimensionale delle immagini ed applicando opportuni algoritmi, calcola i valori di un parametro comunemente utilizzato per quantificare la colocalizzazione di due oggetti indipendenti: il coefficiente di Manders (Manders, 1993). Gli istogrammi mostrati in Figura 12 rappresentano i valori medi percentuali del coefficiente di Manders ottenuti nei diversi campioni di cellule co-transfettate e come si può notare il suo valore risulta aumentato di circa il 10% in tutti casi di sovraespressione, ad eccezione che nelle cellule transfettate con il costrutto per l'espressione di α -sin 1-97.

Figura 11

Misura delle interazioni tra mitocondri e RE nelle cellule sovraesprimenti α -sin, α -sin 1-97, parkina e DJ-1. In figura è presentata la ricostruzione tridimensionale dei mitocondri e del RE in cellule HeLa sovraesprimenti mtRFP ed erGFP con il plasmide vuoto o con le proteine di nostro interesse. Le cellule sono state eccitate separatamente a 488nm o 543nm e le immagini sono state acquisite al microscopio confocale. Il merge delle immagini è mostrato per ogni condizione. Il colore giallo indica l'area di contatto tra i due organelli. Gli stack sono stati acquisiti ogni 0,2 μ m lungo l'asse z (per un totale di 40 immagini) con un obiettivo 63X.

Fig.11



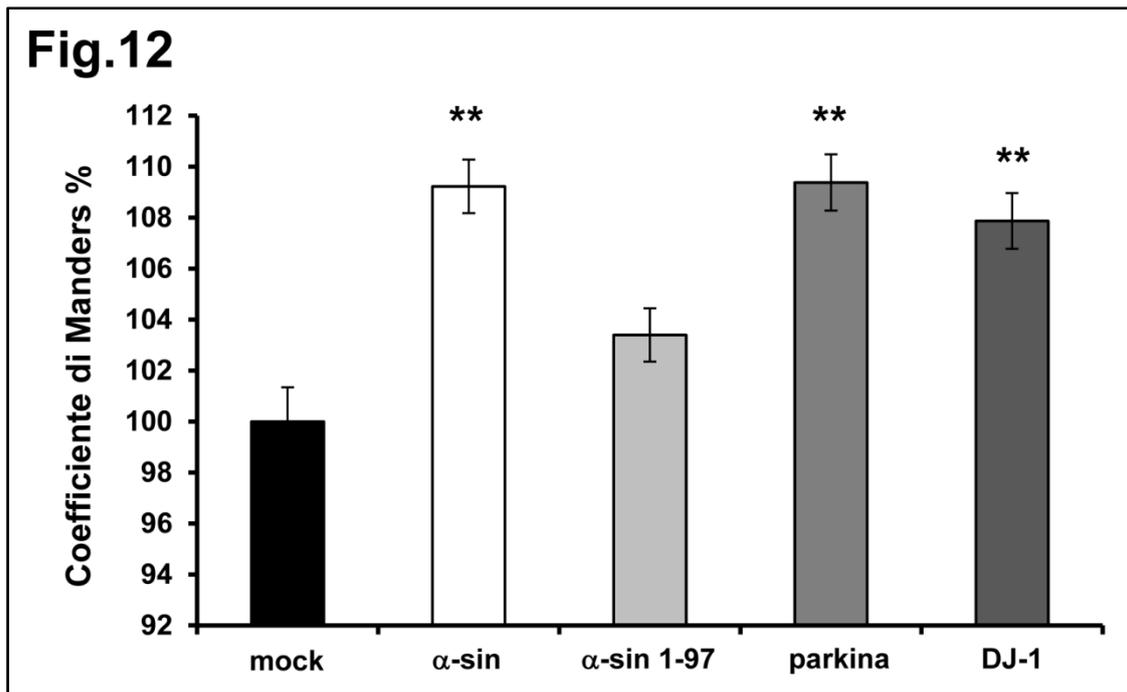


Figura 12

Valori del coefficiente di Manders rappresentanti le interazioni tra mitocondri e RE.

Gli istogrammi in figura rappresentano i valori del coefficiente di Manders misurati con ImageJ sulle stack sull'asse z ottenute al confocale (n>53 cellule in 3 diversi esperimenti).

Considerati questi risultati possiamo quindi ipotizzare che α -sin, parkina e DJ-1 possano mediare direttamente o tramite l'interazione con altre proteine del RE o dei mitocondri la formazione dei siti di contatto tra i due organelli: questa ipotesi suggestiva è sostenuta da evidenze recenti che mostrano che sia α -sin (Jin et al., 2007), che DJ-1 (Li et al., 2005a) che parkina (Yang et al., 2011) interagiscono fisicamente con grp75, una glicoproteina con funzione di chaperone molecolare e che localizza nelle zone di contatto tra RE e mitocondri, le cosiddette "frazioni cellulari associate a membrane" (MAMs, dall'inglese mitochondria-associated ER-membranes), e che si è dimostrata essenziale nel potenziare il trasferimento di Ca^{2+} dal RE ai mitocondri attraverso VDAC, il canale cationico presente sulla membrana mitocondriale esterna. Per questo motivo abbiamo deciso di analizzare se anche le nostre proteine potessero localizzarsi nelle MAMs. Abbiamo condotto l'analisi sull'omogenato cellulare ottenuto da cervelli di topi adulti del ceppo FWB. Il frazionamento cellulare è stato ottenuto come descritto nella sezione Materiali e Metodi e la Figura 13 mostra i risultati ottenuti. Le proteine β -tubulina e VDAC sono state utilizzate come marcatori del compartimento citosolico e della membrana mitocondriale esterna per controllare la purezza delle frazioni cellulari ottenute. I campioni caricati nel Western blot sono i seguenti: l'estratto cellulare totale TCE (corsia 1 e 2 del Western blot) di cellule SH-SY5Y e HeLa è stato utilizzato come controllo positivo per DJ-1, nelle corsie 3, 4, 5, 6 e 7 sono stati caricati l'estratto totale (TCE)

e le frazioni cellulari ottenute dai cervelli di topo, rispettivamente la frazione citosolica (cit), la frazione mitocondriale cruda (crudo), cioè costituita dai mitocondri non ancora purificati dalle membrane di RE, la frazione mitocondriale pura (puro), cioè i mitocondri senza membrane del RE e la frazione corrispondente alle MAMs. Come si può notare la banda relativa a DJ-1 è esclusa dalla frazione mitocondriale pura, mentre è presente sia nella frazione mitocondriale cruda che risulta nella frazione cellulare corrispondente alle MAMs.

Per quanto riguarda α -sin non è stato possibile, al momento, ottenere alcun risultato perché l'anticorpo utilizzato per il suo riconoscimento ha fornito un segnale estremamente aspecifico sugli estratti cellulari di cervello di topo; per quanto riguarda parkina non abbiamo ancora indagato questo aspetto.

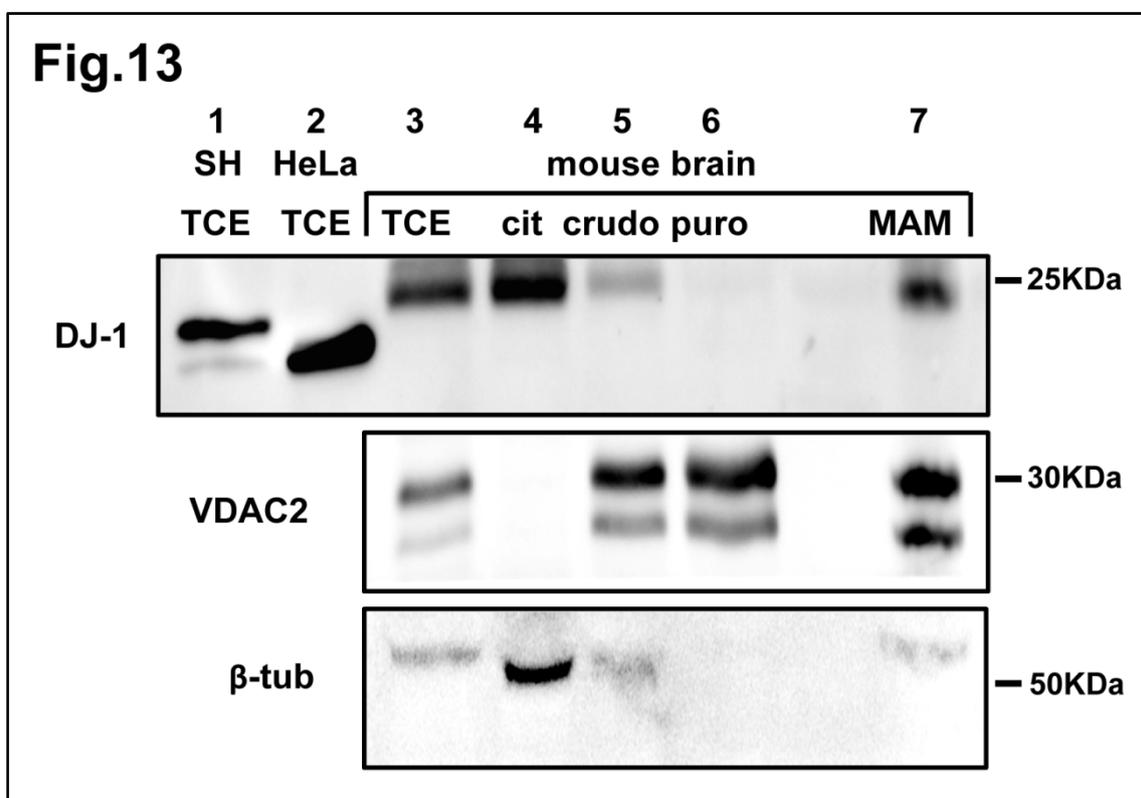


Figura 13

DJ-1 è presente nella frazione corrispondente alle MAM nei lisati di cervelli di topo.

I lisati di cervelli di topo (ceppo FWB) sono stati sottoposti a frazionamento subcellulare e il lisato totale (TCE), le frazioni citosolica, mitocondriale cruda (mitocondri con ancora membrane del RE presenti), mitocondriale pura (mitocondri senza membrane del RE) e MAM (frazione corrispondente ai punti di contatto tra mitocondri e RE) sono state sottoposte all'analisi del Western blot utilizzando l'anticorpo anti-DJ-1. Come controllo positivo anche i lisati totali di cellule HeLa e cellule SH-SY 5Y transfettate con DJ-1 sono stati caricati. Come marker delle MAM è stato utilizzato l'anticorpo anti-VDAC1. Come controllo della contaminazione citosolica delle MAM è stato utilizzato un anticorpo anti β -tubulina.

2.1.9 Misura dell'ATP citosolica e mitocondriale in seguito a stimolazione InsP3-mediata in cellule HeLa sovraesprimenti α -sin, parkina e DJ-1.

L'ingresso di Ca^{2+} nei mitocondri in seguito alla stimolazione cellulare è accoppiato alla attivazione di tre deidrogenasi del ciclo di Krebs ed ad un aumento della produzione di ATP attraverso il processo di fosforilazione ossidativa, direttamente proporzionale all'entità dei transienti di Ca^{2+} generati nei mitocondri (Jouaville et al., 1999). Visti gli effetti delle tre proteine studiate sull'omeostasi mitocondriale del Ca^{2+} , ci è sembrato opportuno analizzare se potessero influire anche sulla produzione di ATP della cellula, considerato anche che riduzioni di livelli di ATP come conseguenza di disfunzioni mitocondriali sono state riscontrate nei cervelli di pazienti affetti da MP sia sporadico che genetico. Per monitorare la produzione di ATP a livello mitocondriale abbiamo utilizzato un'altra sonda ricombinante, la luciferasi, indirizzata alla matrice mitocondriale (mtLUC). Per un'analisi più completa abbiamo anche monitorato i livelli di ATP nel citoplasma utilizzando una sonda di luciferasi senza sequenze di direzionamento specifiche (cytLUC). Le cellule HeLa co-transfettate con mtLUC o cytLUC e la proteina d'interesse sono state perfuse con una soluzione fisiologica contenente luciferina (ovvero il substrato della luciferasi, si veda la sezione Materiali e Metodi per i dettagli sperimentali) e l'emissione di luce è stata misurata al luminometro. Le cellule sono state poi stimolate con istamina per innescare l'aumento transiente della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare e il conseguente aumento della produzione di ATP. Gli istogrammi presentati in Figura 14 rappresentano la media percentuale (espressa come numero di fotoni emessi in ogni secondo; CPS, counts per second) della differenza tra il livello di ATP basale prima della stimolazione cellulare e il livello raggiunto dopo stimolazione. Com'è possibile notare la sovraespressione di α -sin e DJ-1 riduce in maniera significativa la produzione mitocondriale di ATP, mentre parkina non ha alcun effetto. Tuttavia, a livello di ATP citosolico non si osservano riduzioni nel caso delle cellule che sovraesprimono α -sin e DJ-1, mentre si osserva un aumento dei livelli nel caso delle cellule che sovraesprimono parkina. Questi dati risultano apparentemente discordanti rispetto ai dati ottenuti monitorando i livelli di Ca^{2+} mitocondriale, rispetto ai quali ci si sarebbe aspettato di misurare un aumento della produzione di ATP mitocondriale. Tuttavia possono essere spiegati alla luce del fatto che sia α -sin che DJ-1 possano direttamente modulare l'attività del complesso I della catena respiratoria mitocondriale (Devi et al., 2008; Ellis et al., 2005; Hayashi et al., 2009; Mullett and Hinkle, 2011). Per quanto riguarda l'effetto di parkina sui livelli di ATP citosolico al momento non abbiamo una spiegazione, anche se è stato visto che è in grado di modificare l'espressione di alcuni complessi della catena respiratoria (Kuroda et al., 2006a; Palacino et al., 2004).

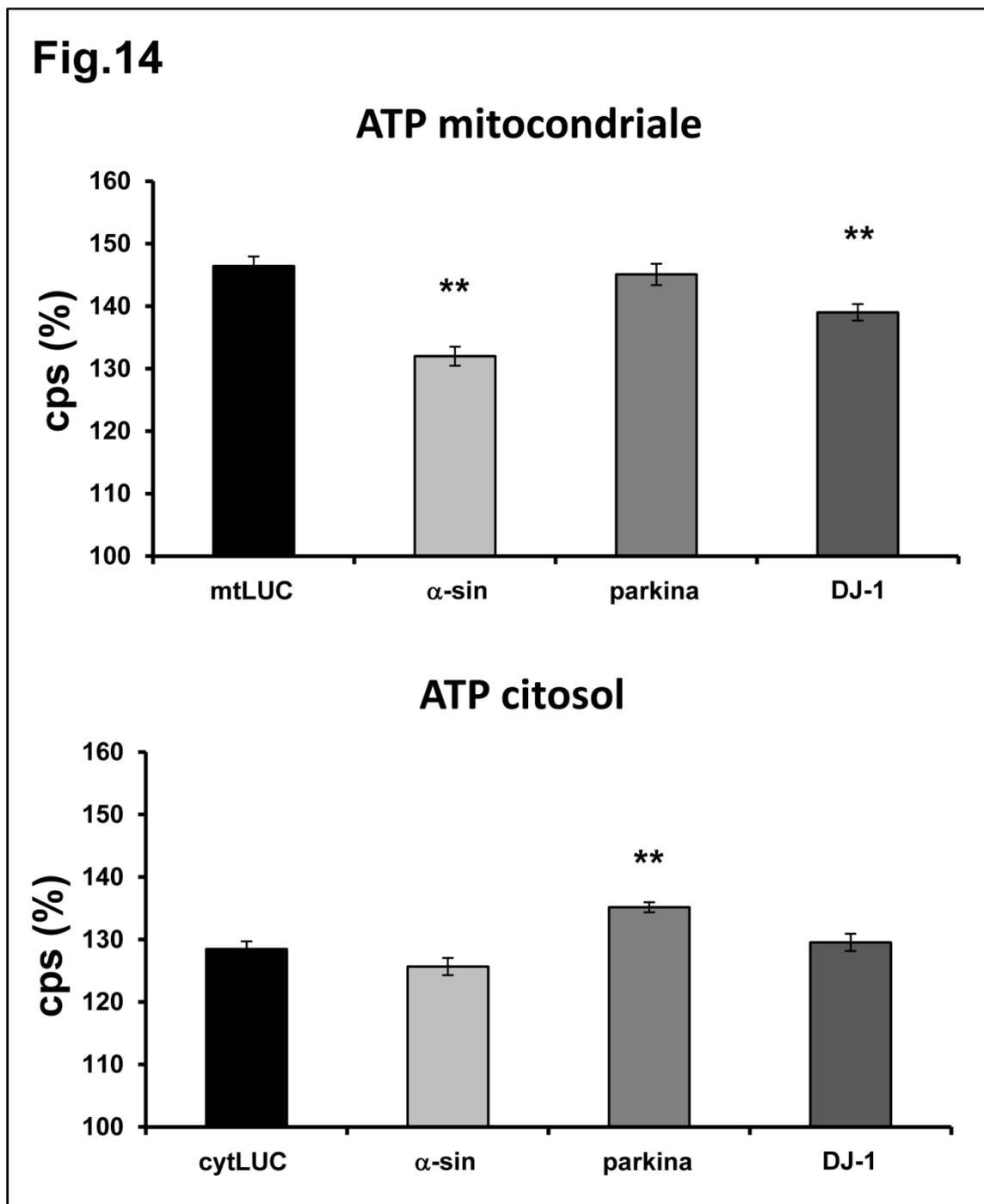


Figura 14

Misura della produzione di ATP mitocondriale e citosolica in seguito a stimolo InsP3-mediato.

Le cellule HeLa sono state transfettate con le sonde basate sulla luciferina mtLUC o cytLUC e con il plasmide vuoto o con α -sin, α -sin 1-97, parkina e DJ-1. Le cellule sono state perfuse con la soluzione KRB-glucosio contenete luciferina 20 μ M per misurare la produzione di ATP basale, in seguito al tampone è stata aggiunta istamina 100 μ M per scatenare la risposta al Ca²⁺ InsP3-mediata, e indurre transientemente una produzione di ATP maggiorata all'interno delle cellule. I valori di emissione di luce misurati in seguito a stimolo sono stati normalizzati con la produzione basale di ATP ed espressi in valore percentuale. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori ottenuti utilizzando la sonda mitocondriale mtLUC (n>10) e la sonda citosolica cytLUC (n>8).

2.2 Caratterizzazione degli effetti di silenziamento delle proteine α -sin, parkina e DJ-1 in cellule modello.

Una volta analizzati gli effetti della sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1, abbiamo deciso di verificare se il fenotipo osservato dipendesse proprio dall'attività di ciascuna proteina sovraespressa. A questo proposito abbiamo deciso di silenziare i livelli endogeni di espressione di α -sin, parkina e DJ-1, mediante trattamento delle cellule con piccoli RNA interferenti (siRNA) commercialmente disponibili.

2.2.1 Analisi dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali e della morfologia mitocondriale in cellule trattate con siRNA specifici per α -sin, parkina e DJ-1.

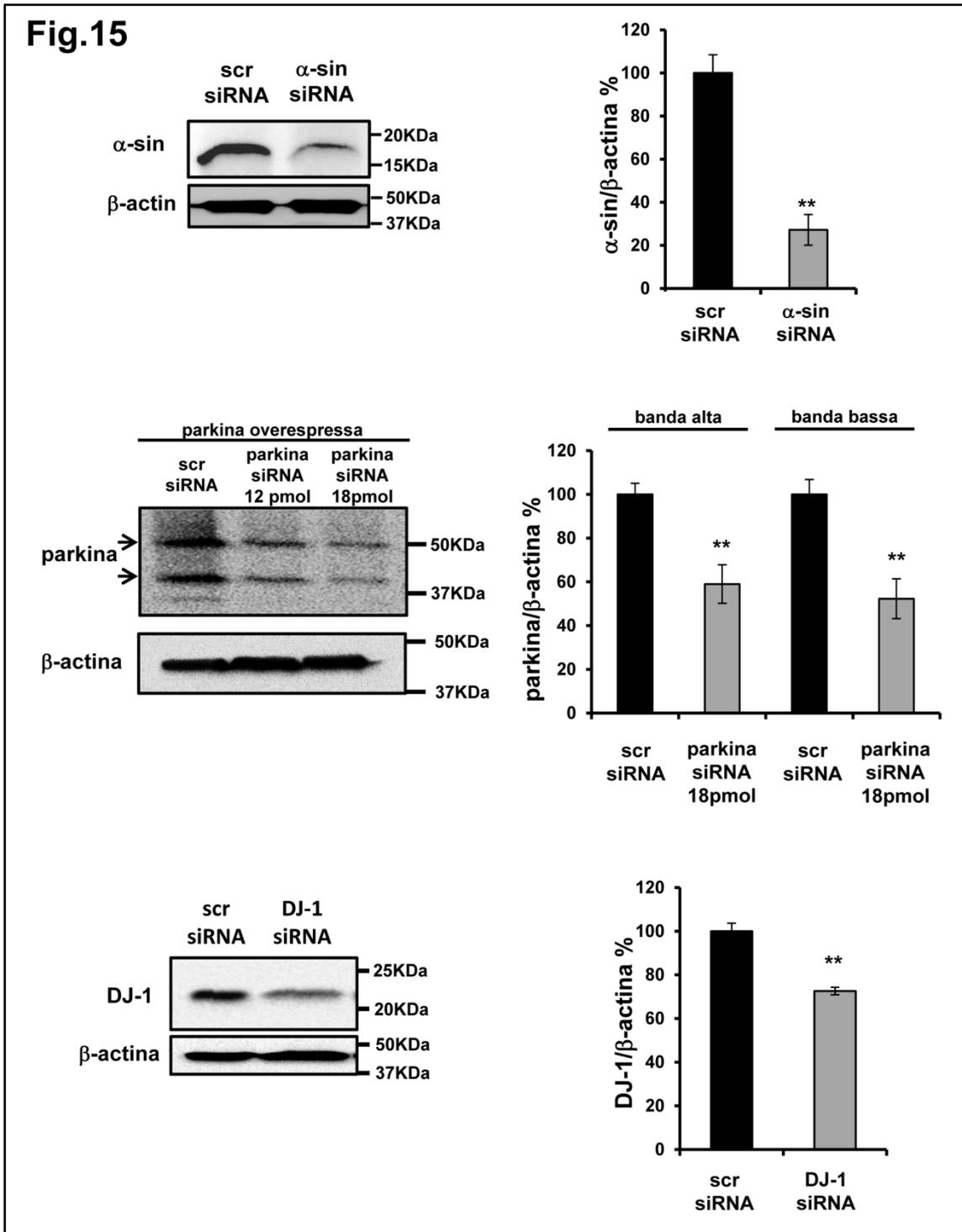
Inizialmente abbiamo dovuto definire le condizioni di trattamento per ottenere un'efficace e significativa sottoregolazione dei livelli di espressione delle diverse proteine. Si rimanda alla sezione Materiali e Metodi per la descrizione delle condizioni scelte. La Figura 15 mostra l'analisi mediante Western blot del livello di silenziamento ottenuto in cellule trattate con i siRNA specifici per le tre proteine. Gli istogrammi mostrano la quantificazione dell'intensità delle bande ottenute nei diversi esperimenti: nel caso di α -sin abbiamo ottenuto una riduzione dei livelli endogeni pari circa all'80%, per quanto riguarda parkina e DJ-1 di circa il 45% rispetto alla quantità di proteina sovraespressa. Per parkina abbiamo dovuto analizzare l'efficacia del siRNA sulla proteina sovraespressa in cellule perché non è possibile visualizzare mediante Western blot la proteina endogena. Per quanto riguarda il silenziamento di α -sin e DJ-1 sono state utilizzate cellule HeLa che possiedono buoni livelli endogeni di queste proteine; per quanto riguarda parkina, invece, che è assente in cellule HeLa (e comunque scarsamente espressa anche in altri tipi cellulari), sono state utilizzate le cellule SHSY-5Y, che esprimono la proteina in esame (Lutz et al., 2009). Tuttavia siccome i livelli di espressione endogeni sono comunque molto bassi e non visualizzabili mediante Western blot, abbiamo anche verificato l'efficacia del trattamento con siRNA sulle cellule transfettate con il vettore di espressione per parkina.

Figura 15

Western blot e analisi densitometrica di cellule HeLa o SH-SY 5Y trattate con siRNA di controllo o contro α -sin, parkina e DJ-1.

Le cellule HeLa sono state trattate con siRNA di controllo (scr) o contro α -sin e DJ-1 per 48 ore. Le cellule SH-SY 5Y sono state transfettate con il plasmide esprimente parkina e trattate con i siRNA di controllo (scr)

o contro parkina per 48 ore (a due diverse concentrazioni, delle quali la 18pmol è stata scelta per i successivi esperimenti).



Una volta ottimizzate le condizioni di silenziamento abbiamo analizzato i transienti di Ca^{2+} mitocondriale indotti dalla stimolazione cellulare sempre utilizzando la sonda mtAEQ co-transfettata con il siRNA di interesse. Come mostrato in Figura 16 la riduzione dei livelli di espressione di α -sin e DJ-1 in cellule HeLa e di parkina in cellule SH-SY 5Y, provoca una

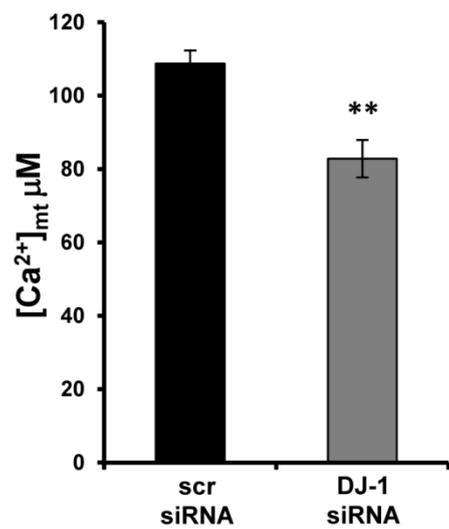
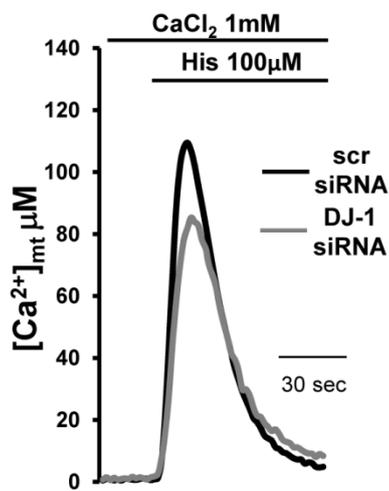
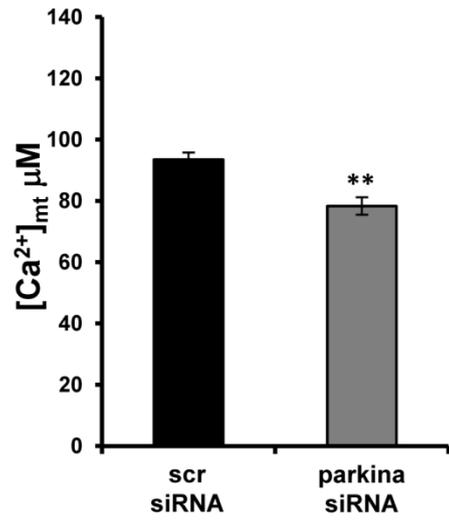
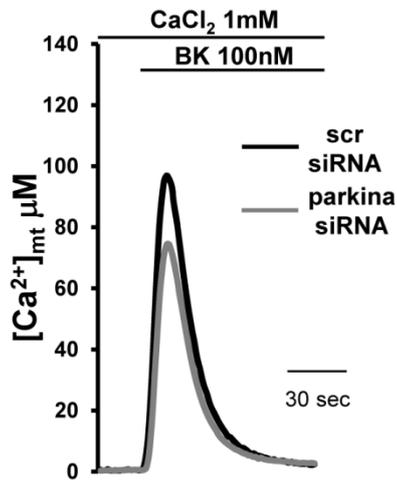
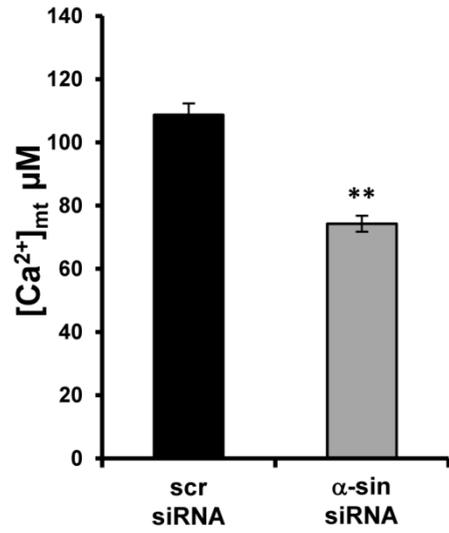
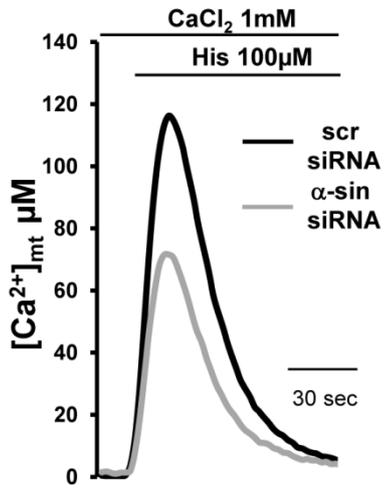
riduzione significativa dell'ampiezza dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale rispetto alle cellule di controllo. Questo dimostra come le tre proteine prese in esame, oltre ad avere un effetto sul Ca^{2+} mitocondriale in seguito alla loro sovraespressione, siano indispensabili per la corretta omeostasi dello ione nell'organello, in quanto, la riduzione del loro livello di espressione, provoca un'alterazione dell'accumulo di Ca^{2+} nei mitocondri.

Figura 16

Il trattamento con siRNA contro α -sin, parkina e DJ-1 induce un'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale.

Le cellule HeLa sono state transfettate con mtAEQ e trattate con i siRNA di controllo o contro α -sin e DJ-1 per 48 ore. In seguito la misura dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali è stata effettuata dopo stimolazione con 100 μ M istamina. Le cellule SH-SY 5Y sono state transfettate con mtAEQ e trattate con i siRNA di controllo o contro parkina per 48 ore. In seguito la misura dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali è stata effettuata dopo stimolazione con 100nM bradichinina. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori di $[\text{Ca}^{2+}]$ dopo stimolazione (n>14). Le tracce sono rappresentative di un singolo esperimento.

Fig.16



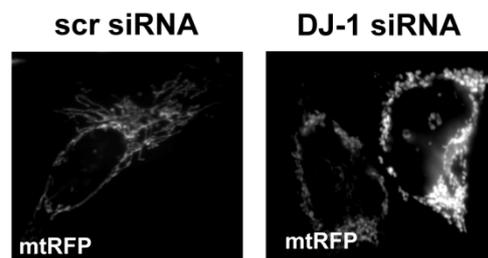
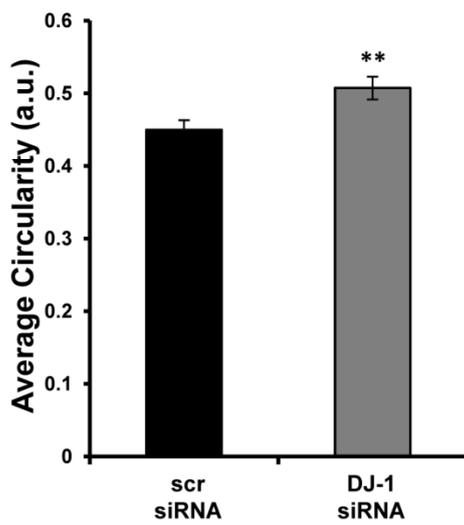
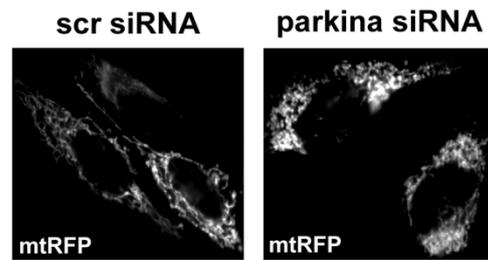
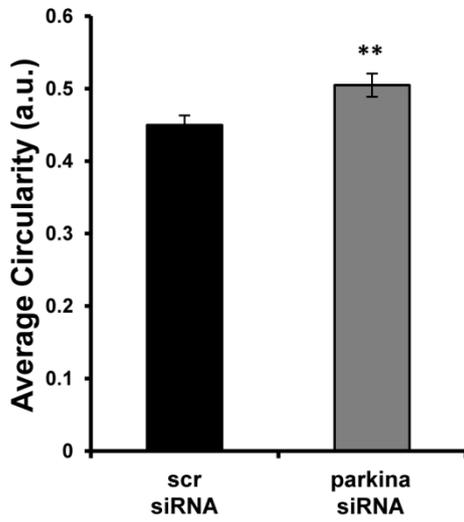
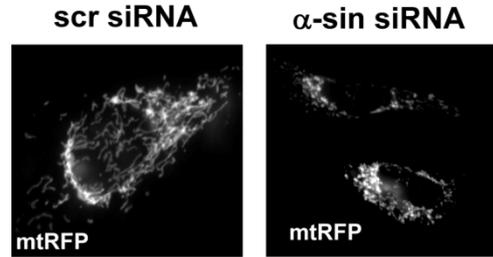
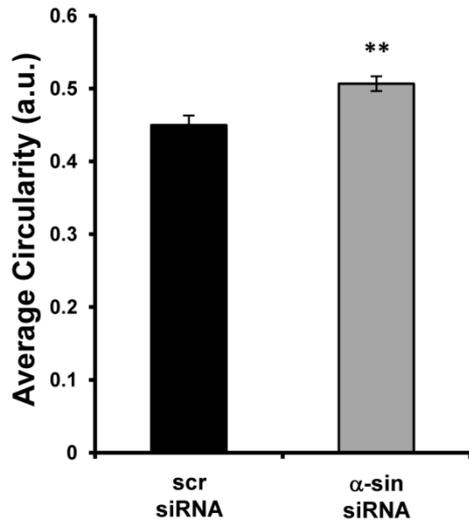
In parallelo alle misure di Ca^{2+} nelle cellule trattate con i siRNA specifici per le tre proteine, abbiamo anche analizzato la morfologia mitocondriale. La Figura 17 mostra l'analisi al microscopio confocale della morfologia mitocondriale in cellule transfettate con la sonda fluorescente rossa mtRFP e precedentemente trattate con i siRNA specifici per α -sin, parkina e DJ-1 come indicato nei rispettivi pannelli. Le cellule di controllo sono rappresentate da cellule trattate con sequenze oligonucleotidiche casuali (scr siRNA). Com'è possibile vedere dalle immagini, i mitocondri appaiono frammentati e la morfologia mitocondriale risulta drasticamente compromessa rispetto alle cellule trattate col siRNA di controllo. Le immagini raccolte sono state in seguito analizzate utilizzando uno specifico software per calcolare alcuni parametri che vengono utilizzati per classificare la morfologia mitocondriale, tra questi il valore di circolarità media dei mitocondri di ogni cellula. Tale valore è espresso in unità arbitrarie ed è può variare da un valore minimo di zero, che corrisponde ad un oggetto di forma allungata, ad un valore massimo di 1 che corrisponde ad un oggetto di forma circolare. La quantificazione nei diversi campioni è mostrata dagli istogrammi e mette chiaramente in evidenza che il trattamento con i siRNA specifici per le tre proteine induce un aumento della circolarità media dei mitocondri nelle cellule positive alla mtRFP, indice di frammentazione mitocondriale e di disaggregazione del reticolo mitocondriale. Anche in questo caso per quanto riguarda α -sin e DJ-1 sono state utilizzate cellule HeLa, mentre per quanto riguarda parkina, sono state utilizzate cellule SH-SY5Y. Quindi α -sin, parkina e DJ-1 oltre ad essere indispensabili per la corretta omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale, sembrano essere necessarie per mantenere la corretta morfologia dei mitocondri nelle cellule.

Figura 17

Il silenziamento di α -sin, parkina e DJ-1 altera la morfologia mitocondriale.

Le cellule HeLa sono state transfettate con mtRFP e trattate con i siRNA di controllo o contro α -sin e DJ-1. Le cellule SH-SY 5Y sono state transfettate con mtRFP e trattate con i siRNA di controllo o contro parkina. Le cellule successivamente sono state sottoposte ad analisi di immunocitochimica. La fluorescenza dell'mtRFP rivela che i mitocondri risultano avere una morfologia alterata nelle cellule trattate con i siRNA specifici per le proteine di nostro interesse rispetto alle cellule trattate con i siRNA di controllo. Gli istogrammi rappresentano il valore di circolarità media dei mitocondri ottenuto mediante l'analisi delle immagini con il software ImageJ (n>20 in 2 diversi esperimenti). Il valore di 1 delle unità arbitrarie (a.u.) indica un cerchio perfetto.

Fig.17



2.3 α -sinucleina

Alla luce dei dati presentati fino a questo che hanno evidenziato alcuni aspetti condivisi per le proteine α -sin, parkina e DJ-1, per meglio comprendere il significato del loro effetto sull'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale e per cercare i determinati molecolari di questi effetti, abbiamo deciso di approfondire alcuni aspetti a seconda delle caratteristiche delle singole proteine. Per quanto riguarda α -sin, il fatto che la sua sovraespressione abbia gli stessi effetti della sovraespressione di proteine considerate avere un ruolo protettivo è apparso un po' sorprendente, anche considerato che alcuni autori hanno descritto alterazioni mitocondriali ed effetti tossici in cellule transfettate con plasmidi di espressione per α -sin, sia nella sua forma nativa che nelle forme mutate. Abbiamo quindi voluto correlare la possibilità di effetti discrepanti con il fatto che potessero dipendere dalla quantità di proteina sovraespressa. Abbiamo quindi cercato di modularne i livelli di espressione utilizzando due protocolli sperimentali alternativi alla transfezione di plasmidi per l'espressione ricombinante.

2.3.1 Modulazione dei livelli endogeni di α -sin mediante incubazione con acido valproico ed analisi degli effetti sui transienti di Ca^{2+} mitocondriale.

Per stabilire una possibile correlazione tra la quantità di α -sin espressa e il controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale abbiamo deciso di provare a modulare l'espressione di α -sin utilizzando l'acido valproico (VPA). Questa sostanza, infatti, è in grado di indurre un'espressione di α -sin in maniera dose e tempo dipendente (Leng and Chuang, 2006). Le cellule HeLa sono state trattate per 6 giorni incubando VPA nel terreno di coltura alle dosi indicate in Figura 18. La Figura 18A mostra i livelli di espressione di α -sin endogena in seguito al trattamento con dosi crescenti di VPA. Come si può notare l'aumento dei livelli di espressione di α -sin endogena è proporzionale alla dose di VPA. La Figura 18B mostra l'analisi immunocitochimica che oltre a rivelare un marcato aumento dell'espressione della proteina direttamente proporzionale alle dosi di trattamento, evidenzia anche che, ad elevate dosi di VPA ($\geq 250\mu\text{M}$), avviene una ridistribuzione intracellulare della α -sin endogena che appare localizzata in foci citoplasmatici, che ricordano una distribuzione precedentemente descritta sia in cellule di lievito che in cellule di mammifero che sovraesprimono altri livelli di proteina (Auluck et al., 2010; Gitler et al., 2008). Le misure dei transienti mitocondriali di Ca^{2+} nelle cellule sottoposte a questo trattamento e successivamente transfettate con la sonda mtAEQ mostrano, a basse concentrazioni di VPA, un aumento dei picchi del Ca^{2+} paragonabili a quelli osservati precedentemente nelle cellule transfettate con il plasmide per α -sin; a

dosi elevate di VPA invece mostrano una riduzione dei picchi dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali che oltre a correlare con l'aumento consistente dei livelli di espressione, correla anche con la perdita della localizzazione citosolica e la redistribuzione in foci localizzati. Le Figure 18C e D mostrano l'analisi statistica e le tracce rappresentative degli esperimenti descritti. Per escludere la possibilità che la riduzione dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale potesse dipendere da un effetto tossico del VPA ad alte dosi piuttosto che dalla redistribuzione intracellulare di α -sin abbiamo analizzato la morfologia mitocondriale nelle cellule trattate con VPA e transfettate con mtRFP o mtGFP. La Figura 18E mostra che il trattamento non interferisce con la corretta morfologia mitocondriale: i mitocondri delle cellule trattate appaiono morfologicamente simili a quelli delle cellule di controllo. Inoltre abbiamo effettuato anche un'analisi immunocitochimica per verificare la possibilità che i foci citoplasmatici di α -sin co-localizzassero, almeno parzialmente, con i mitocondri. L'analisi al microscopio confocale ha però escluso questa possibilità (Figura 18F).

I risultati ottenuti e descritti fino a questo punto in cellule HeLa, nelle quali i livelli di espressione di α -sin sono stati modulati con protocolli sperimentali differenti, sembrano suggerire un quadro generale che indica un ruolo essenziale di α -sin nel controllo dell'omeostasi mitocondriale del Ca^{2+} . Quando la funzione di α -sin viene meno, o in seguito alla riduzione dei suoi livelli di espressione (si vedano gli esperimenti di silenziamento descritti nel paragrafo 2.2.1) o in seguito al suo accumulo eccessivo, che porta a una redistribuzione intracellulare, si osserva un effetto su un parametro cellulare importante: l'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale. Considerando lo stretto legame tra omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale e metabolismo energetico, e che, come già anticipato, la comunicazione RE-mitocondri e il corretto trasferimento di Ca^{2+} tra questi due compartimenti sono essenziali per sostenere le esigenze metaboliche della cellula, abbiamo deciso di analizzare se il processo autofagico potesse subire variazioni in relazione ai livelli di espressione di α -sin ed ai suoi effetti sui transienti mitocondriali dello ione Ca^{2+} . Per valutare l'autofagia abbiamo monitorato in Western blot i livelli di LC3 e di p62, due proteine comunemente utilizzate come marcatori di autofagia. La Figura 18G mostra che il rapporto tra la forma II lipidata di LC3, che corrisponde a 16kDa, e la forma I che corrisponde a 18kDa (LC3II/LC3I), aumenta alle dosi di trattamento di VPA che inducono la riduzione dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale, mentre i livelli di p62 calano, ad indicare una maggiore attivazione del processo autofagico in queste condizioni. L'analisi densitometrica dell'intensità del segnale delle bande ottenute in esperimenti differenti dimostra come queste variazioni siano statisticamente significative.

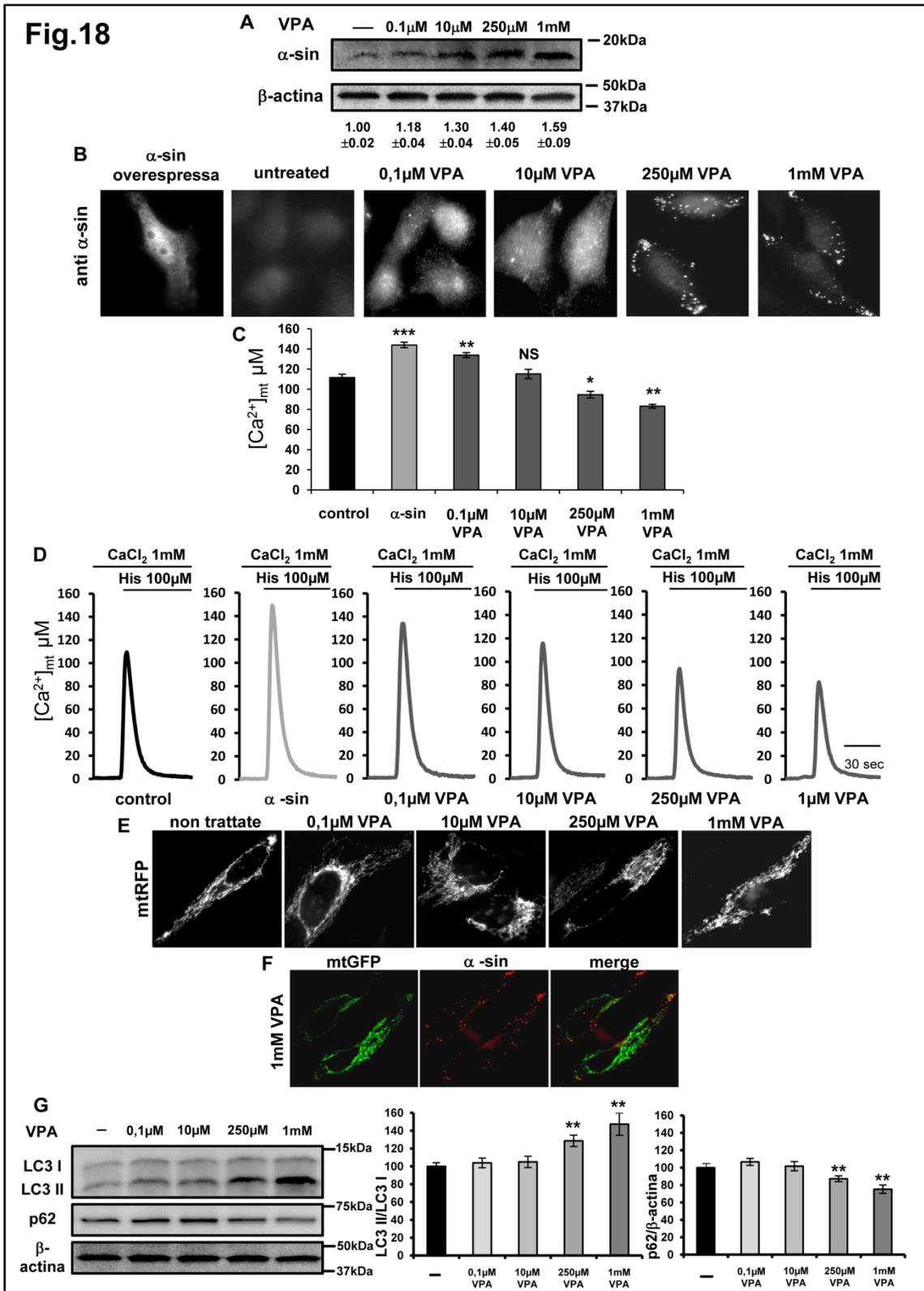


Figura 18

Il trattamento con acido valproico (VPA) aumenta in modo dose-dipendente il contenuto endogeno di α -sin, induce la sua redistribuzione in foci citoplasmatici e influisce sui transienti di Ca²⁺ mitocondriali e sul processo autofagico.

Le cellule HeLa sono state trattate con le dosi indicate di VPA per 6 giorni e in seguito transfettate con mtAEQ o mtGFP o mtRFP. Nella figura sono mostrati: il Western blot, l'analisi densitometrica (A) e

l'analisi d'immunocitochimica (B) dei livelli di espressione di α -sin e la sua distribuzione cellulare in seguito al trattamento con VPA. L'analisi statistica (C) ($n > 6$) e un esperimento rappresentativo (D) delle misure di Ca^{2+} mitocondriali in seguito a stimolazione con istamina $100\mu\text{M}$. La morfologia mitocondriale è stata osservata al microscopio a fluorescenza analizzando le cellule cotransfettate con mtRFP (E). In (F) è mostrata l'immunocitochimica per α -sin delle cellule trattate con 1mM VPA e transfettate con mtGFP. Come mostrato non è presente una colocalizzazione tra il segnale dell'mtGFP e il segnale dato da α -sin. I mitocondri inoltre non risultano morfologicamente compromessi. La valutazione del processo autofagico in cellule trattate con VPA (G) è mostrata mediante analisi dei livelli di LC3I, LC3II e p62 con Western blot e rispettiva misura densitometrica.

2.3.2 Analisi degli effetti del trattamento con TAT- α -sin a concentrazioni crescenti.

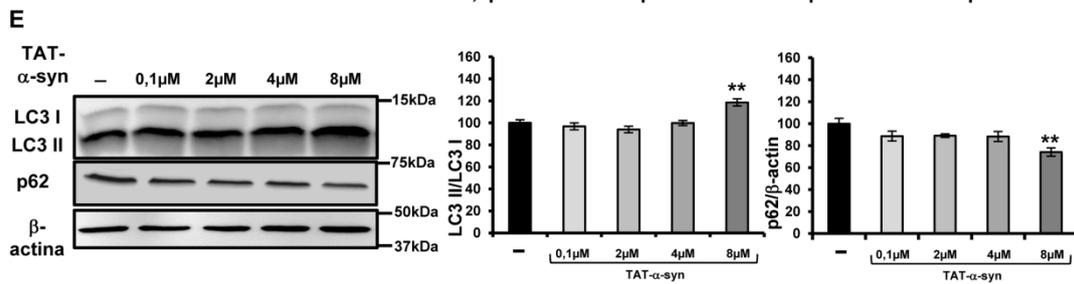
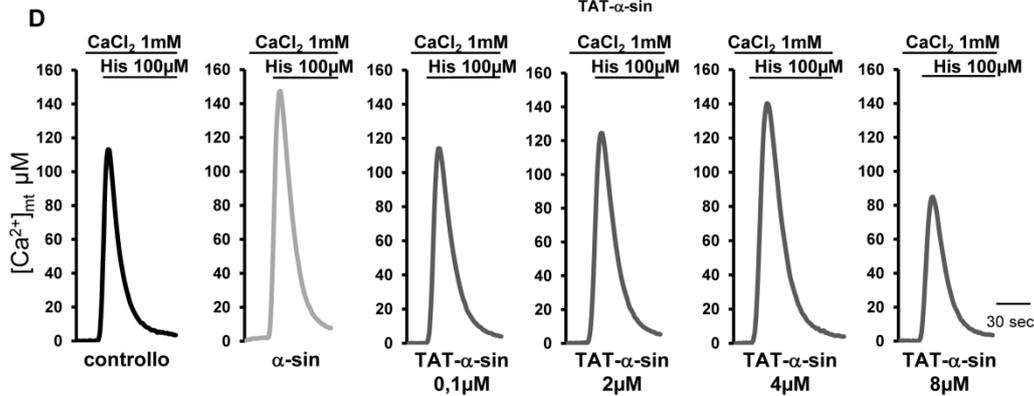
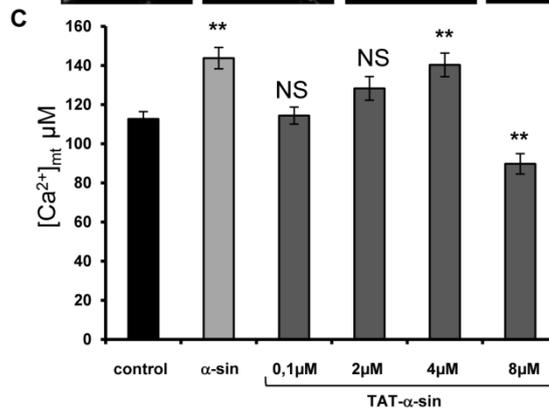
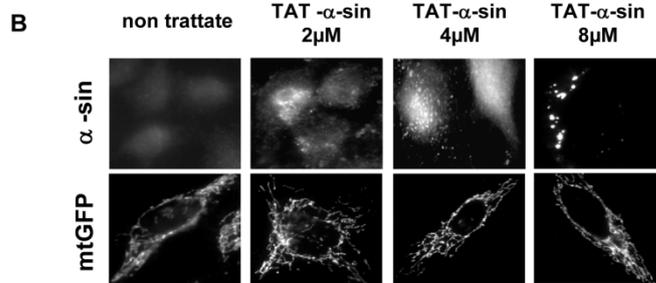
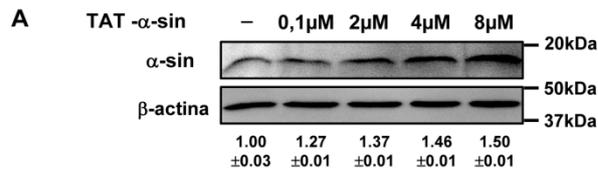
Per escludere che gli effetti mediati dal VPA potessero essere una conseguenza di una risposta generica alla sostanza e non di un effetto diretto della redistribuzione e della variazione dei livelli di α -sin, abbiamo provato a modulare la concentrazione intracellulare della proteina mediante l'incubazione con concentrazioni crescenti di una proteina di fusione TAT- α -sin (Albani et al., 2004). La sequenza virale TAT è infatti stata dimostrata essere molto efficiente nel mediare il trasporto di proteine ad essa fuse attraverso le membrane cellulari (Gump and Dowdy, 2007). Come mostrato in Figura 19A e B, il Western blot e il saggio d'immunocitochimica rivelano un aumento dose-dipendente del segnale dato da α -sin, con una parallela redistribuzione della proteina dal citoplasma ai foci citosolici precedentemente osservati. Anche in questo caso la morfologia mitocondriale è stata analizzata mediante la sovraespressione di una mtGFP, senza tuttavia riscontrare alterazioni della struttura di questi organelli. A basse dosi di TAT- α -sin ($4\mu\text{M}$) si osserva un aumento dei transienti mitocondriali di Ca^{2+} inseguito alla stimolazione cellulare, a dosi più elevate ($8\mu\text{M}$) α -sin, è completamente rilocalizzata nei foci citoplasmatici e si osserva una riduzione dei transienti di Ca^{2+} . La Figura 19C e D mostra gli istogrammi della media dei picchi ottenuti durante le misurazioni e le tracce rappresentative degli esperimenti. Per verificare se anche in queste condizioni sperimentali potesse innescarsi un aumento di autofagia abbiamo monitorato i livelli del rapporto LC3II/LC3I e di p62: anche in questo caso si è osservato un aumento del flusso autofagico corrispondente all'incubazione con $8\mu\text{M}$ TAT- α -sin e concomitante con la riduzione dei livelli di Ca^{2+} nei mitocondri, come documentato in Figura 19E.

Figura 19

L'introduzione TAT-mediata di α -sin nelle cellule HeLa aumenta in modo dose-dipendente il contenuto endogeno di α -sin, induce la sua redistribuzione in foci citoplasmatici e influisce sui transienti di Ca^{2+} mitocondriali e sul processo autofagico.

Le cellule HeLa sono state transfettate con mtAEQ e mtGFP e poi incubate con le dosi indicate di TAT- α -sin. La figura mostra: Western blot (A) e immunolocalizzazione (B) della TAT- α -sin. L'analisi statistica ($n > 5$) e gli esperimenti rappresentativi delle misure di Ca^{2+} mitocondriali sono rappresentati nei pannelli (C) e (D) rispettivamente. L'analisi dell'autofagia è mostrata nel pannello (E) mediante visualizzazione e densitometria di LC3I, LC3II e p62.

Fig.19



2.3.3 Analisi degli effetti della delezione del dominio C-terminale di α -sin.

Una delle modificazioni post-trascrizionali di α -sin riscontrate in cervelli di pazienti affetti da MP, è la delezione del suo dominio C-terminale. Studi condotti in vitro hanno inoltre messo in evidenza che questa modificazione inoltre è in grado di favorire l'aggregazione della proteina nativa in vitro (Li et al., 2005b). Per questi motivi e considerato il fatto che al dominio C-terminale si attribuisce un ruolo di chaperone molecolare nella interazione di α -sin con altre proteine, ci è parso interessante studiare gli effetti della sovraespressione della forma troncata di α -sin, in cui sono stati rimossi gli ultimi 43 amminoacidi (α -sin 1-97) sull'omeostasi mitocondriale del Ca^{2+} . Utilizzando un antisiero di coniglio, gentilmente fornitoci dalla dott.ssa E. Greggio dell'Università di Padova (l'anticorpo in nostro possesso, infatti, era in grado di riconoscere solo la parte C-terminale della proteina), abbiamo visualizzato, mediante immunocitochimica, che il mutante deleto presenta una distribuzione citosolica, uguale a quella mostrata dalla forma nativa della proteina (Figura 20A). Questo anticorpo però non ha consentito alcuna visualizzazione della α -sin 1-97 in Western blot per analizzarne i livelli di espressione. Tuttavia abbiamo proseguito gli esperimenti, andando ad analizzare gli effetti della sovraespressione di α -sin 1-97 sui transienti mitocondriali di Ca^{2+} e non abbiamo riscontrato differenze tra le cellule di controllo e le cellule transfettate con la forma mutante (Figura 20B). Per verificare che l'assenza di effetto non dipendesse da uno scarso livello di espressione della forma mutata, abbiamo costruito due proteine di fusione tra α -sin 1-97 e α -sin nativa e l'epitopo immunogenico c-myc (α -sin 1-97-myc). In Figura 20C è mostrata l'espressione delle proteine di fusione e, come si può notare, nonostante l'analisi di Western blot mostri un diverso livello di espressione tra la forma troncata e la forma nativa, entrambe le proteine mostrano pari livelli d'intensità di fluorescenza. Le cellule transfettate sono analizzate in immunocitochimica e presentano la medesima distribuzione citosolica. Questo dato apparentemente in contraddizione con l'informazione ottenuta per Western blot, si spiega tenendo conto che, la conta delle cellule positive alla transfezione dei due diversi costrutti, ha evidenziato livelli molto diversi di efficienza di transfezione: 5% nel caso di α -sin 1-97-myc, 25% nel caso della forma nativa di α -sin (α -sin-myc). Il motivo di tale differenza non è chiaro. La differenza di livello di transfezione non rappresenta comunque un problema per i nostri esperimenti: le misure dei transienti di Ca^{2+} , così come la valutazione dei siti di contratto ER-mitocondri descritta nel paragrafo 2.1.8, infatti, sono ottenute solo dalle cellule co-transfettate con α -sin 1-97-myc ed le sonde di interesse, che, come si può osservare nella Figura 20C, presentano livelli di fluorescenza del tutto paragonabili alle cellule che esprimono α -sin-myc. Possiamo quindi concludere che gli effetti "mitocondriali" di α -sin osservati sono legati alla presenza del dominio C-terminale di α -sin. A ulteriore conferma

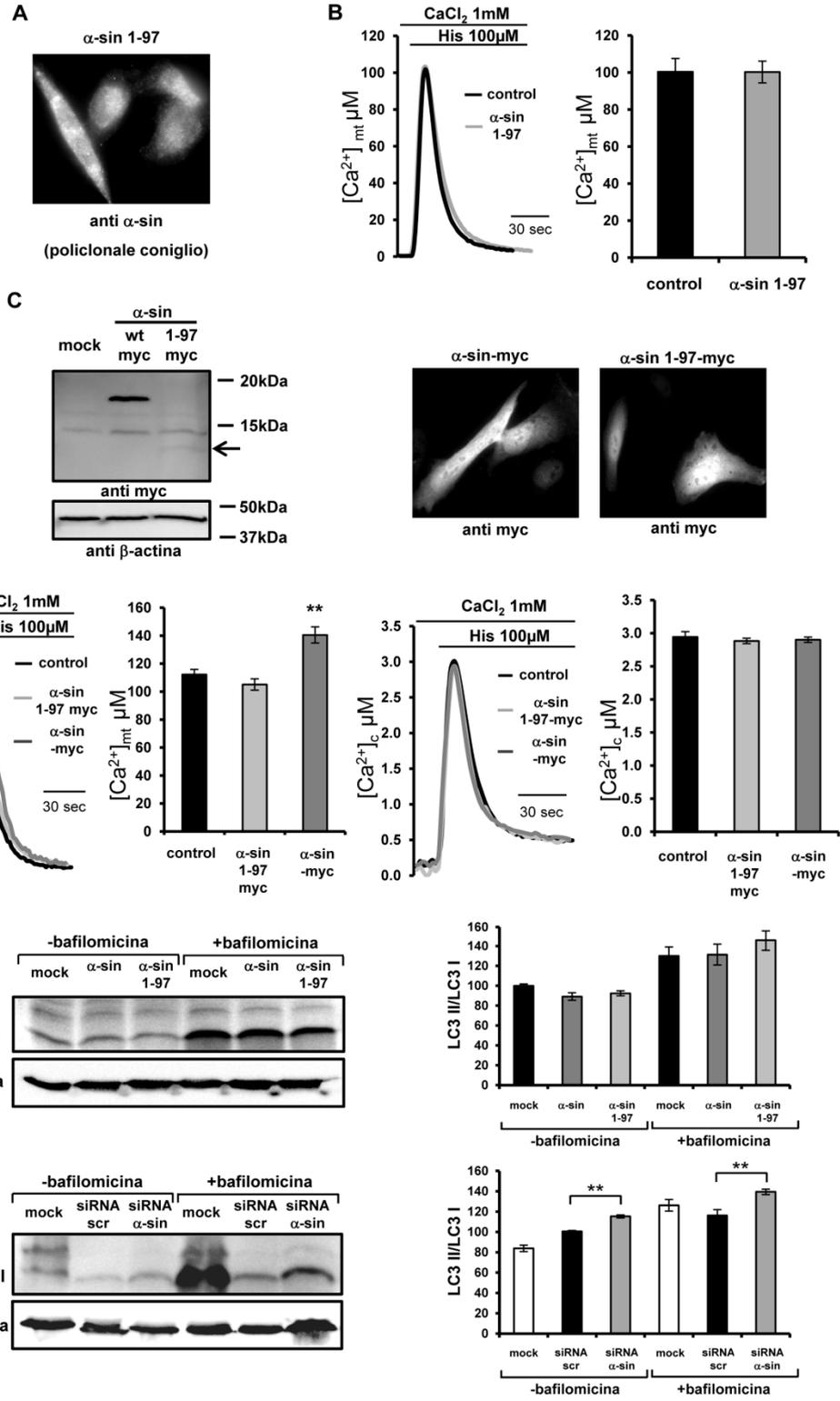
dell'effetto specifico di α -sin sui transienti di Ca^{2+} mitocondriale, sono stati analizzati anche i transienti di Ca^{2+} citosolici. La Figura 20D mostra che nelle cellule sovraesprimenti α -sin-myc e α -sin 1-97-myc non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda il Ca^{2+} citosolico, mentre la misura dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale ha riconfermato il dato già presentato. Anche nel caso della sovraespressione di questi costrutti abbiamo analizzato il processo autofagico. La Figura 20E mostra il Western blot di LC3I e LC3II con la relativa quantificazione del loro rapporto in cellule sovraesprimenti α -sin e α -sin 1-97, con e senza trattamento con bafilomicina, una sostanza che blocca la degradazione delle vescicole autofagiche impedendone la fusione con l'autofagosoma. La bafilomicina permette quindi di visualizzare se un eventuale riduzione di flusso autofagico è legata ad una inibizione della formazione delle vescicole autofagiche piuttosto che ad una loro aumentata degradazione. Dopo il trattamento con bafilomicina si accumula la banda della forma LC3II. Com'è possibile vedere i livelli di LC3II/LC3I non cambiano rispetto al controllo in nessuna condizione: la sovraespressione di α -sin e α -sin 1-97 non influenza il flusso autofagico, proprio come succedeva con i trattamenti a basse dosi con VPA e TAT- α -sin, che non influivano negativamente sui transienti di Ca^{2+} mitocondriale. Per analizzare ancora più approfonditamente il coinvolgimento di α -sin nell'autofagia, in Figura 20F è mostrato il Western blot e la quantificazione del rapporto LC3II/LC3I in cellule trattate con siRNA di controllo e siRNA per α -sin. In seguito al silenziamento di α -sin abbiamo osservato un aumento del rapporto LC3II/LC3I ad indicare un aumento di autofagia, in accordo con i dati presenti in letteratura (Winslow et al., 2010) e con i nostri dati ottenuti in cellule incubate con alte dosi di VPA e di TAT- α -sin, a suggerire che la perdita di funzione di α -sin porta ad un aumento di autofagia. Quest'aumento si osserva anche in seguito al trattamento con bafilomicina.

Figura 20

La delezione della parte C-terminale di α -sin annulla gli effetti della proteina sul Ca^{2+} mitocondriale.

Le cellule HeLa (A) sono state transfettate con α -sin 1-97 e analizzate mediante immunocitochimica utilizzando un anticorpo policlonale di coniglio. In (B) sono mostrati: un grafico rappresentativo della misura dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale in cellule HeLa transfettate con mtAEQ e il plasmide vuoto o con α -sin 1-97, e gli istogrammi con la media dei valori ottenuti ($n > 12$). In (C) sono presentati i dati che analizzano l'espressione e la localizzazione dei costrutti α -sin-myc e α -sin 1-97-myc mediante Western blot e immunocitochimica in cellule HeLa transfettate con i suddetti costrutti o con il plasmide vuoto come controllo. L'anticorpo utilizzato è specifico per l'epitopo immunogeno c-myc. Le cellule HeLa sono poi state transfettate con la sonda mtAEQ o cytAEQ e gli stessi plasmidi per procedere all'analisi dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali e citosolici. In (D) sono presenti i grafici rappresentativi degli esperimenti e gli istogrammi con la media dei valori ottenuti ($n > 11$ per il citosol; $n > 12$ per i mitocondri). L'analisi del processo autofagico (livelli di LC3I e LC3II con relativa densitometria) con e senza l'aggiunta di bafilomicina è mostrata in (E) per le cellule sovraesprimenti α -sin e α -sin 1-97, e in (F) per le cellule non trattate (mock) e trattate con i siRNA contro α -sin e i siRNA di controllo (scr).

Fig.20



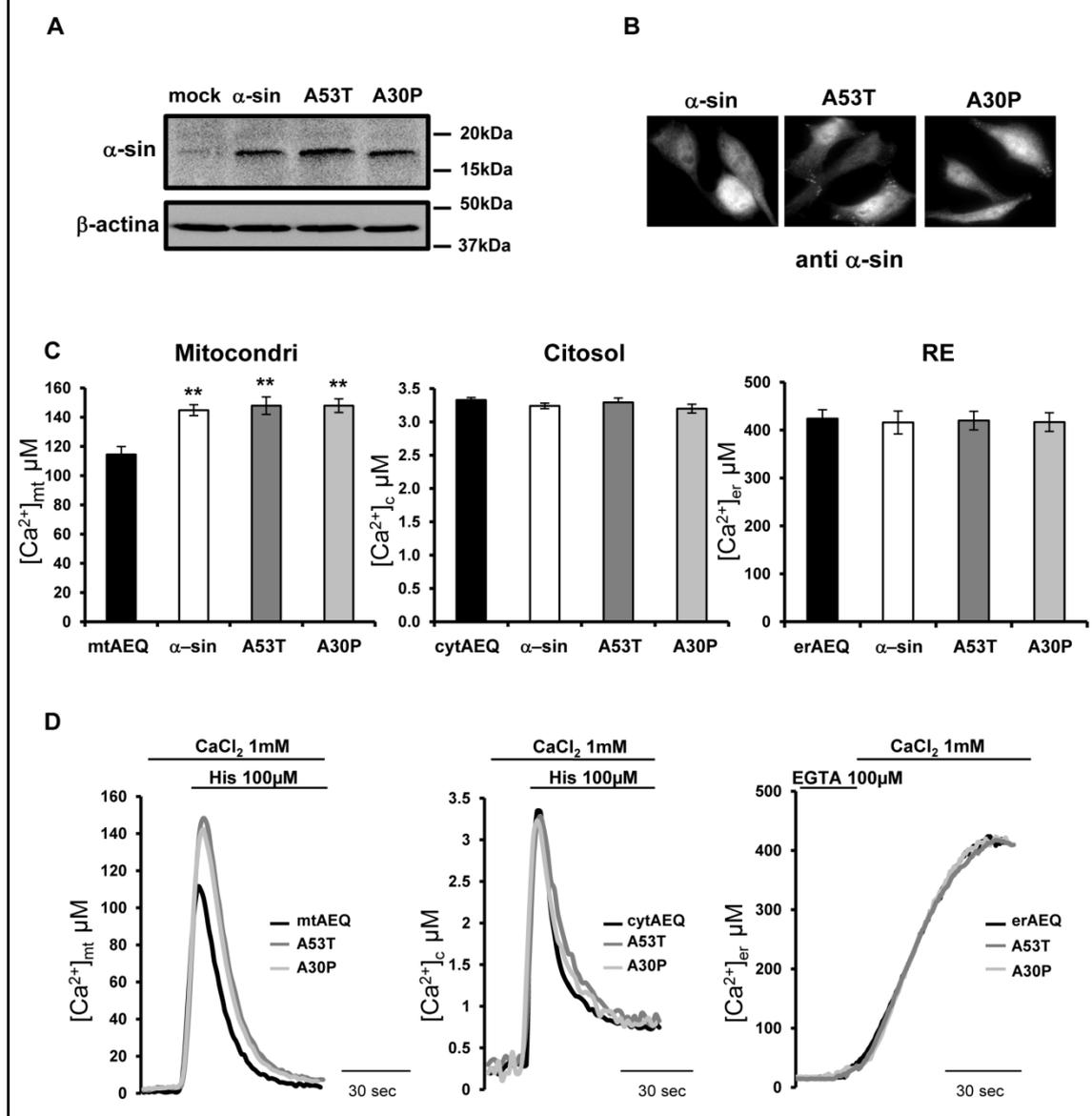
2.3.4 Analisi degli effetti della sovraespressione di due forme mutanti di α -sin associate a MP nell'uomo.

In seguito alla caratterizzazione degli effetti della forma nativa di α -sin abbiamo analizzato gli effetti della sovraespressione di due forme mutanti di α -sin responsabili di forme genetiche di MP nell'uomo: α -sin A53T e α -sin A30P. Le cellule HeLa sono state transfettate con le sonde mtAEQ, cytAEQ e erAEQ insieme ai due mutanti, ed i risultati degli esperimenti sono mostrati in Figura 21. Anche in questo caso sono stati valutati i livelli di espressione e la distribuzione cellulare: come è possibile vedere dal Western blot di Figura 21A, i due mutanti presentano entrambi dei livelli di espressione paragonabili alla forma nativa di α -sin. L'analisi immunocitochimica di Figura 21B mostra che anche in questo caso si osserva una distribuzione citosolica. Bisogna tuttavia sottolineare che in una bassa percentuale di cellule (meno del 5%, dati non mostrati), abbiamo notato la formazione di foci citoplasmatici nei campioni transfettati con i due mutanti. La Figura 21C e D mostra l'effetto sull'omeostasi del Ca^{2+} : anche nel caso dei mutanti abbiamo osservato un aumento dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale in seguito alla stimolazione cellulare, ma nessun effetto sull'omeostasi del Ca^{2+} degli altri compartimenti cellulari.

Figura 21

Caratterizzazione dei mutanti A53T e A30P e loro effetto sull'omeostasi di Ca^{2+} cellulare.

Le cellule HeLa sono state transfettate con il plasmide vuoto o con i plasmidi per le proteine α -sin, A53T e A30P. In (A) e (B) sono visualizzati, rispettivamente, i risultati dell'analisi Western blot e immunocitochimica sulla forma nativa e i rispettivi mutanti. Le cellule HeLa sono poi state transfettate con le sonde mtAEQ, cytAEQ e erAEQ per misurare le concentrazioni di Ca^{2+} nei diversi compartimenti cellulari sovraesprimendo la forma nativa o le forme mutanti A53T e A30P. Gli istogrammi in (C) mostrano la media dei valori di $[\text{Ca}^{2+}]$ misurati ($n > 12$ per i mitocondri; $n > 10$ per il citosol; $n > 15$ per il RE), e in (D) sono presenti le tracce ottenute in un esperimento rappresentativo.

Fig.21

A conferma dell'azione dei mutanti A53T e A30P sull'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale e del fatto che si comportino come la forma nativa per quanto riguarda l'omeostasi dello ione, abbiamo transfettato le cellule HeLa con la sonda mtAEQ e, applicando il protocollo descritto in precedenza, siamo andati ad analizzare il contributo del RE e dell'influsso dall'esterno ai transienti di Ca^{2+} mitocondriali. In Figura 22 sono mostrati gli istogrammi rappresentanti i valori medi dei picchi ottenuti nell'esperimento. Com'è possibile vedere, i due mutanti hanno la medesima azione della forma nativa sulle due vie d'entrata del Ca^{2+} nei mitocondri: sono in grado di aumentare i transienti di Ca^{2+} nei mitocondri per quanto riguarda lo ione proveniente dal RE, e inibiscono l'entrata di Ca^{2+} negli organelli quando lo stesso proviene dall'esterno della cellula.

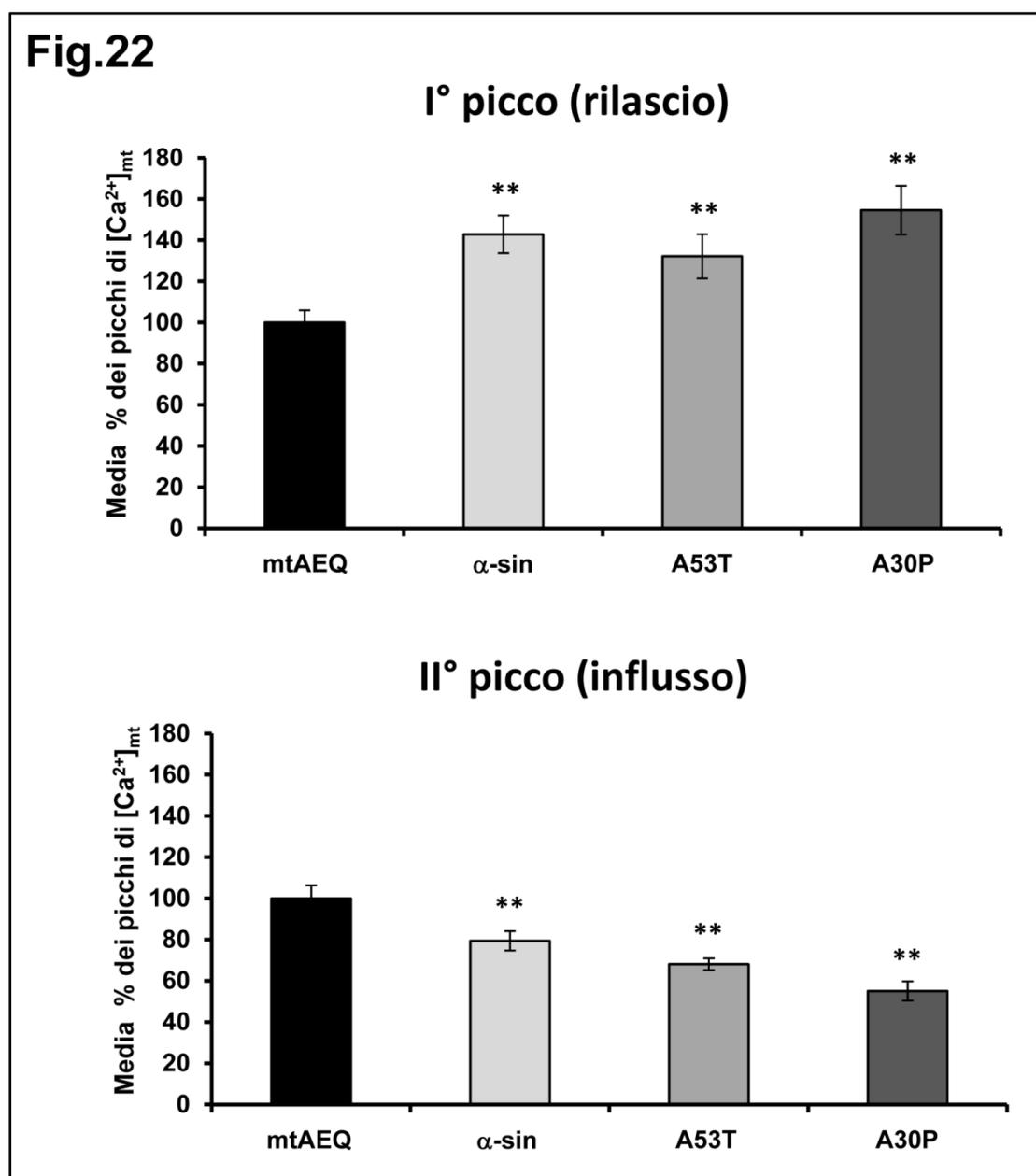


Figura 22

Analisi del contributo della mobilitazione del Ca^{2+} dal RE e dell'influsso del Ca^{2+} dallo spazio extracellulare alla concentrazione di Ca^{2+} mitocondriale nelle cellule sovraesprimenti α -sin, A53T e A30P.

Le cellule HeLa sono state transfettate con la sonda mtAEQ e il plasmide vuoto, o con le proteine di nostro interesse. Per discriminare i due contributi ai transienti di Ca^{2+} mitocondriale, il rilascio di Ca^{2+} InsP3-mediato dai depositi intracellulari è stato separato dall'influsso concomitante attraverso la membrana plasmatica come descritto in precedenza. Gli istogrammi rappresentano la media normalizzata delle $[Ca^{2+}]_{mt}$ misurate (n>12).

A questo punto abbiamo ipotizzato che l'effetto delle mutazioni non fosse di per se legato alla perdita di funzione della proteina α -sin, ma piuttosto che fosse associato ad una maggiore

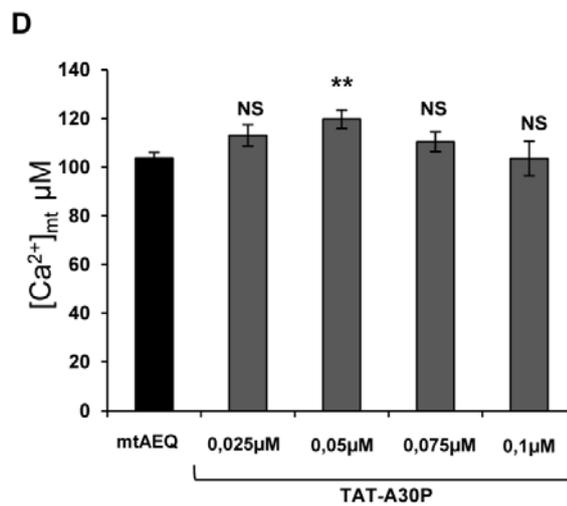
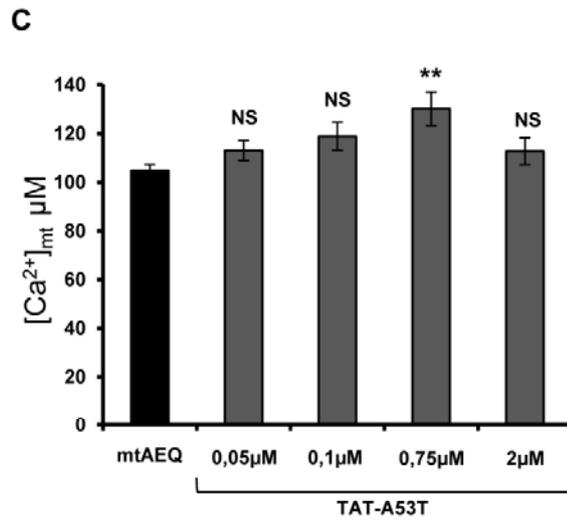
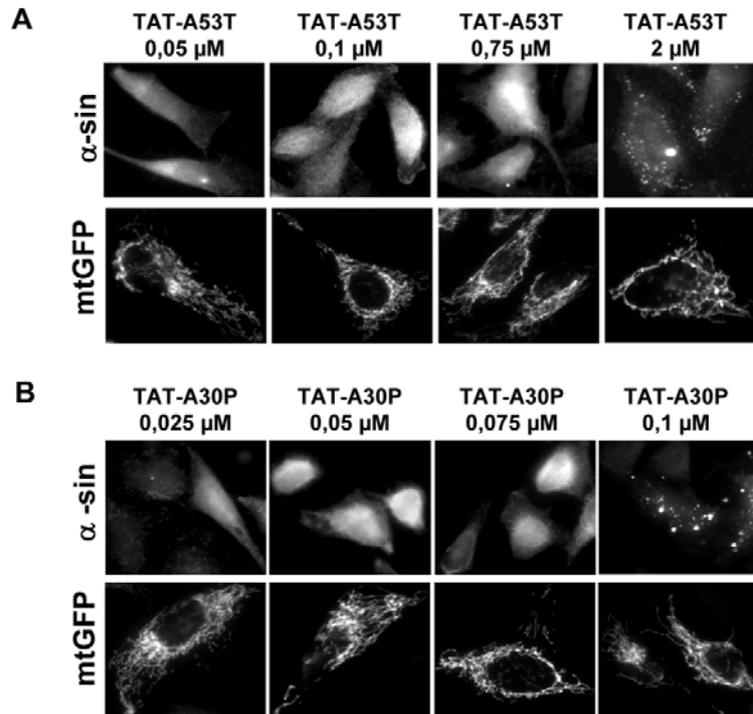
propensità ad assumere una distribuzione cellulare diversa, e che cioè le mutazioni potessero favorire la distribuzione cellulare in foci. Abbiamo quindi anche in questo caso modulato i livelli di espressione delle forme mutanti utilizzando le proteine di fusione TAT. Le cellule HeLa sono state incubate con diverse concentrazioni di TAT-A53T e TAT-A30P come indicato in Figura 23A e B e poi transfettate con la sonda mtAEQ. L'analisi immunocitochimica ha rivelato la comparsa di foci citoplasmatici a dosi inferiori di proteina di fusione rispetto a quelle osservate per la forma nativa: i valori si attestano a 2 μ M per TAT-A53T e a 0,1 μ M per TAT-A30P, rispetto ai valori di 4 μ M per la forma nativa. L'analisi dei transienti di Ca²⁺ mitocondriali in Figura 23C e D tuttavia non correla perfettamente con la distribuzione cellulare delle forme mutate di α -sin, in quanto, nonostante abbiamo osservato un aumento dei transienti a concentrazioni di TAT- α -sin mutanti con distribuzione citosolica, ad elevate dosi non abbiamo osservato la riduzione dei transienti, nonostante i mutanti avessero perso la loro distribuzione citosolica diffusa. Anche in questo caso abbiamo documentato che la morfologia mitocondriale non viene compromessa dal trattamento. Nonostante questo risultato possa apparire in disaccordo con la nostra ipotesi sulla perdita di funzione di α -sin, possiamo speculare che la redistribuzione intracellulare indotta dai mutanti possa coinvolgere solo una porzione della quantità di α -sin endogena e quindi che quella citosolica residua (non apprezzabile in immunocitochimica) possa essere sufficiente a garantire una risposta fisiologica in termini di omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale.

Figura 23

L'introduzione TAT-mediata di A53T e A30P nelle cellule HeLa induce la sua redistribuzione in foci citoplasmatici a concentrazioni più basse della forma nativa e influisce sui transienti di Ca²⁺ mitocondriali.

Le cellule HeLa sono state transfettate con mtAEQ e mtGFP e poi incubate con le dosi indicate di TAT-A53T o TAT-A30P. La figura mostra l'immunolocalizzazione della TAT-A53T e TAT-A30P in (A) e (B) rispettivamente. L'analisi statistica (n>10) e gli esperimenti rappresentativi delle misure di Ca²⁺ mitocondriali sono rappresentati nei pannelli (C) per le cellule trattate con TAT-A53T e (D) per quelle trattate con TAT-A30P.

Fig.23



2.4 Studio della relazione di DJ-1 e p53 nel controllo dell'omeostasi mitocondriale di Ca²⁺.

Considerata la relazione antagonista di DJ-1 e p53 nel controllo della morte cellulare per apoptosi e l'importanza della disregolazione dell'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale, nonché della segnalazione RE-mitochondri, abbiamo considerato interessante approfondire la relazione reciproca di queste due proteine nel controllo dell'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale. A questo proposito sono stati utilizzati due plasmidi per l'espressione di p53, uno che codifica p53 nella sua forma nativa e l'altro che codifica una forma mutante di p53 deleva della sequenza di localizzazione nucleare (p53 Δ NLS) e quindi ad esclusione nucleare. Questo mutante consente di escludere dall'analisi gli effetti trascrizionali di p53 sui suoi geni bersaglio.

2.4.1 Analisi degli effetti di p53 e p53 Δ NLS sui transienti di Ca²⁺ mitocondriale.

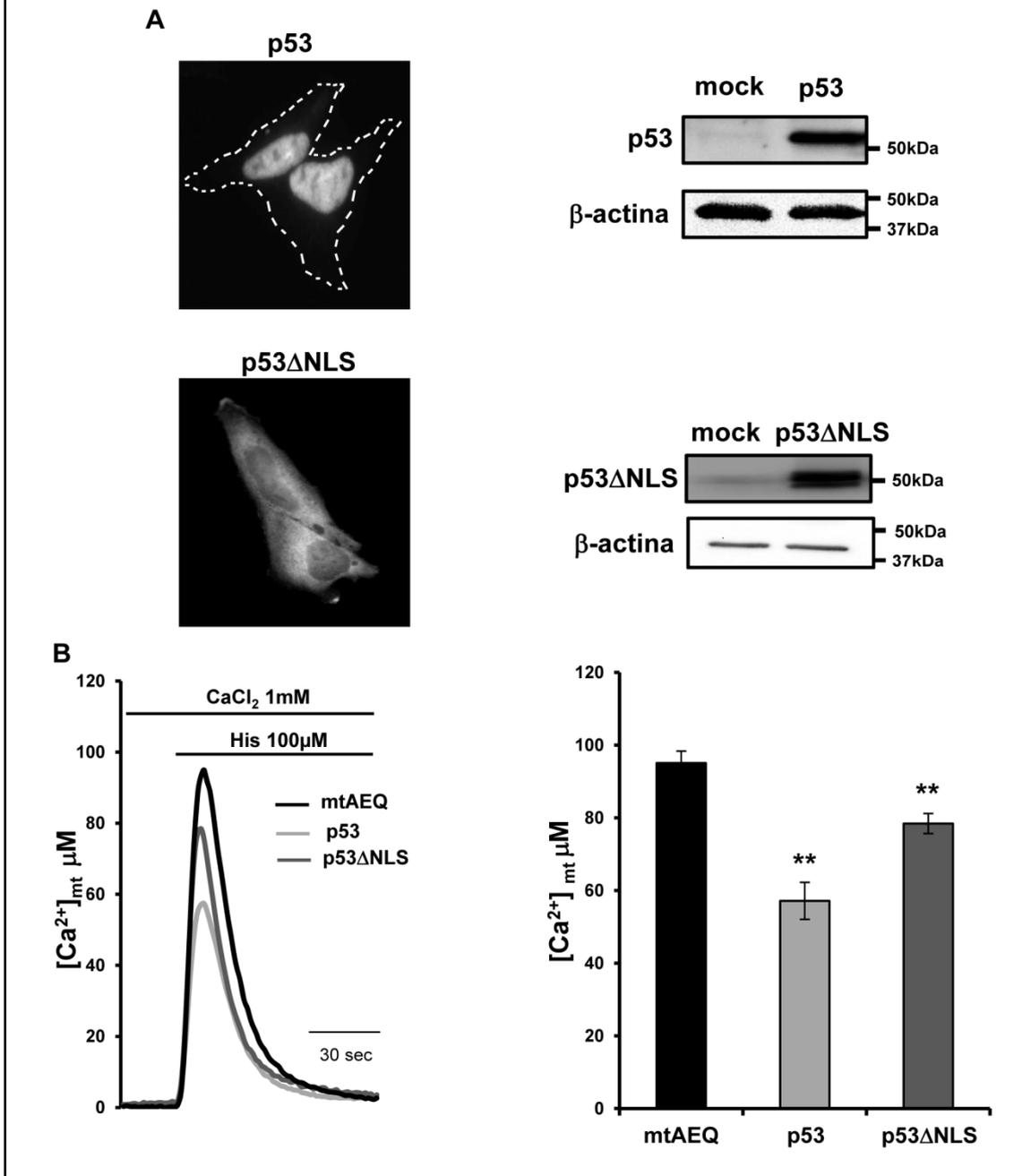
Gli effetti della sovraespressione di p53 e p53 Δ NLS sui transienti di Ca²⁺ mitocondriale indotti da uno stimolo accoppiato alla generazione di InsP3 sono stati analizzati in cellule HeLa co-transfettate con i plasmidi d'interesse e la sonda mtAEQ. Per prima cosa abbiamo analizzato la distribuzione cellulare e i livelli di espressione dei due costrutti di p53. L'analisi immunocitochimica di Figura 24A mostra che p53 sovraespressa ha una localizzazione esclusivamente nucleare, mentre p53 Δ NLS è espressa a livello citosolico. Il Western blot mostra livelli di espressione equivalenti dei due costrutti e mostra anche che i livelli endogeni di p53 nelle cellule HeLa sono trascurabili, rendendo così impossibile una quantificazione dei livelli di sovraespressione. La Figura 24B mostra le misure dei transienti mitocondriale di Ca²⁺, e come si può notare sia dalle tracce rappresentative che dall'analisi quantitativa dell'altezza dei picchi di Ca²⁺, la sovraespressione di p53 e p53 Δ NLS causa una riduzione significativa dei transienti mitocondriale rispetto alle cellule di controllo transfettate solo con la sonda mtAEQ.

Figura 24

Caratterizzazione della sovraespressione delle proteine p53 e p53 Δ NLS in cellule HeLa e loro effetti sui transienti di Ca²⁺ mitocondriale.

Le cellule HeLa sono state transfettate con la sonda mtAEQ e con il plasmide vuoto o con le proteine di nostro interesse. In (A) sono rappresentate l'analisi d'immunocitochimica e Western blot. Mentre le tracce rappresentative di un esperimento e gli istogrammi delle medie sono presentati in (B) (n>7).

Fig.24



2.4.2 Analisi degli effetti di p53 e p53ΔNLS sui transienti di Ca²⁺ citosolici e sui livelli di Ca²⁺ nel RE.

Per avere un quadro completo dell'omeostasi del Ca²⁺ nelle cellule HeLa sovraesprimenti le proteine in esame, abbiamo deciso di analizzare anche i transienti di Ca²⁺ citosolici sfruttando la sonda cytAEQ. Com'è mostrato in Figura 25A, la sovraespressione di p53 e p53ΔNLS non

modifica i transienti di Ca^{2+} citosolici. Nel pannello B invece sono mostrati i livelli di Ca^{2+} nel RE, in cellule HeLa sovraesprimenti p53. Come si può notare la sovraespressione della proteina causa un aumento del 15% del contenuto di Ca^{2+} del RE. L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} nel RE correla con il ruolo pro-apoptotico di p53; è infatti stato ampiamente dimostrato che un aumento del contenuto di Ca^{2+} dei depositi intracellulari renda le cellule più suscettibili agli insulti apoptotici e che, viceversa, una sua riduzione rappresenti una condizione protettiva (Pinton et al., 2008). Tuttavia, tale risultato appare di difficile interpretazione rispetto alla riduzione dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali descritta nel paragrafo precedente. Inoltre per approfondire l'analisi, sarebbe opportuno misurare i livelli di Ca^{2+} nel RE sovraesprimendo la proteina p53 Δ NLS.

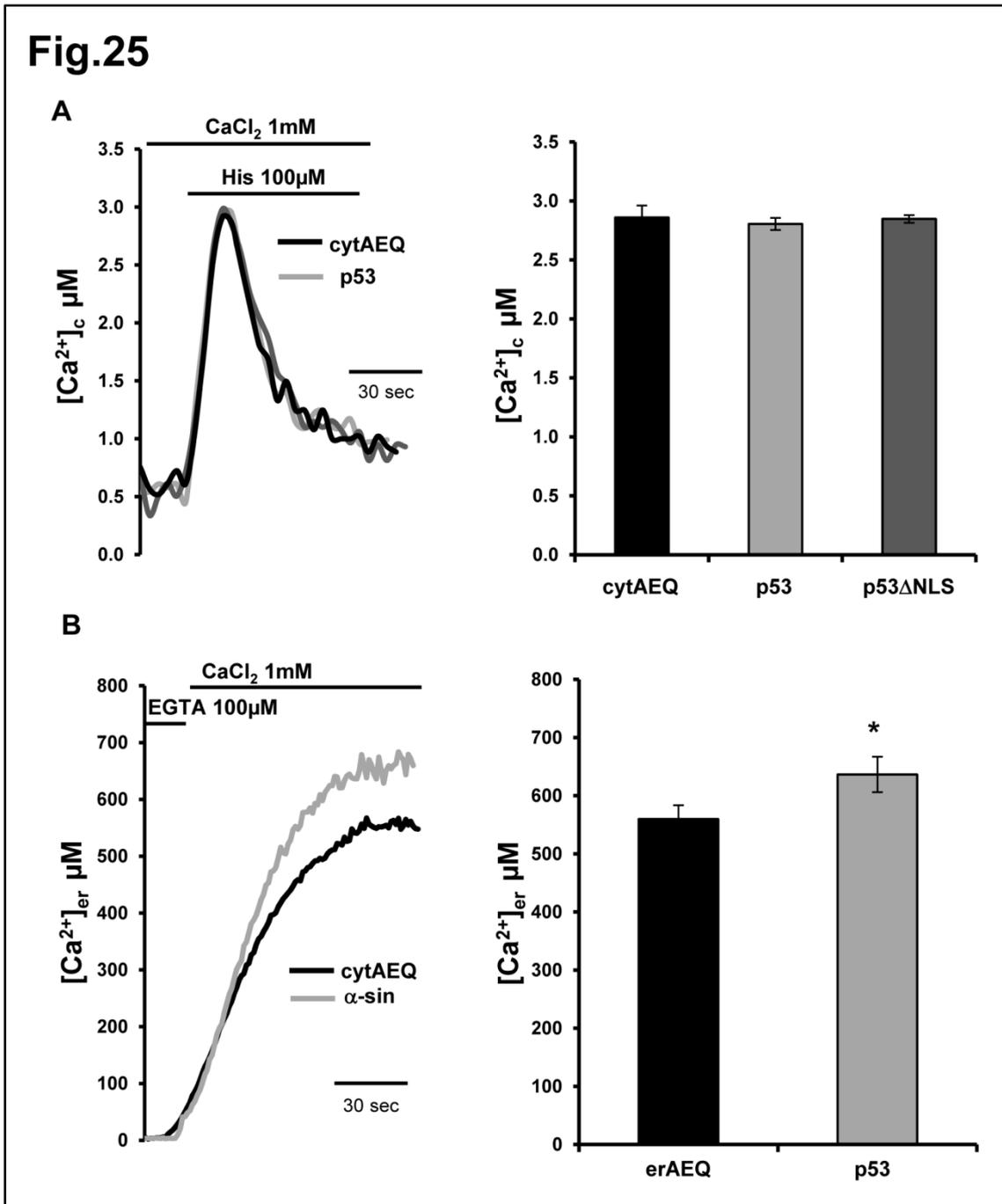


Figura 25

Analisi dei transienti di Ca^{2+} citosolici in seguito a stimolo e misura della concentrazione di Ca^{2+} nel RE in cellule HeLa sovraesprimenti p53 e p53ΔNLS.

Le cellule HeLa sono state transfettate con la sonda cytAEQ o erAEQ e con il plasmide vuoto o con le proteine p53 e p53ΔNLS. In (A) e (B) sono presentate le tracce rappresentative degli esperimenti e gli istogrammi con le medie dei valori di $[\text{Ca}^{2+}]$ misurate nel citosol (A) ($n>6$) e RE (B) ($n>15$) come descritto in precedenza.

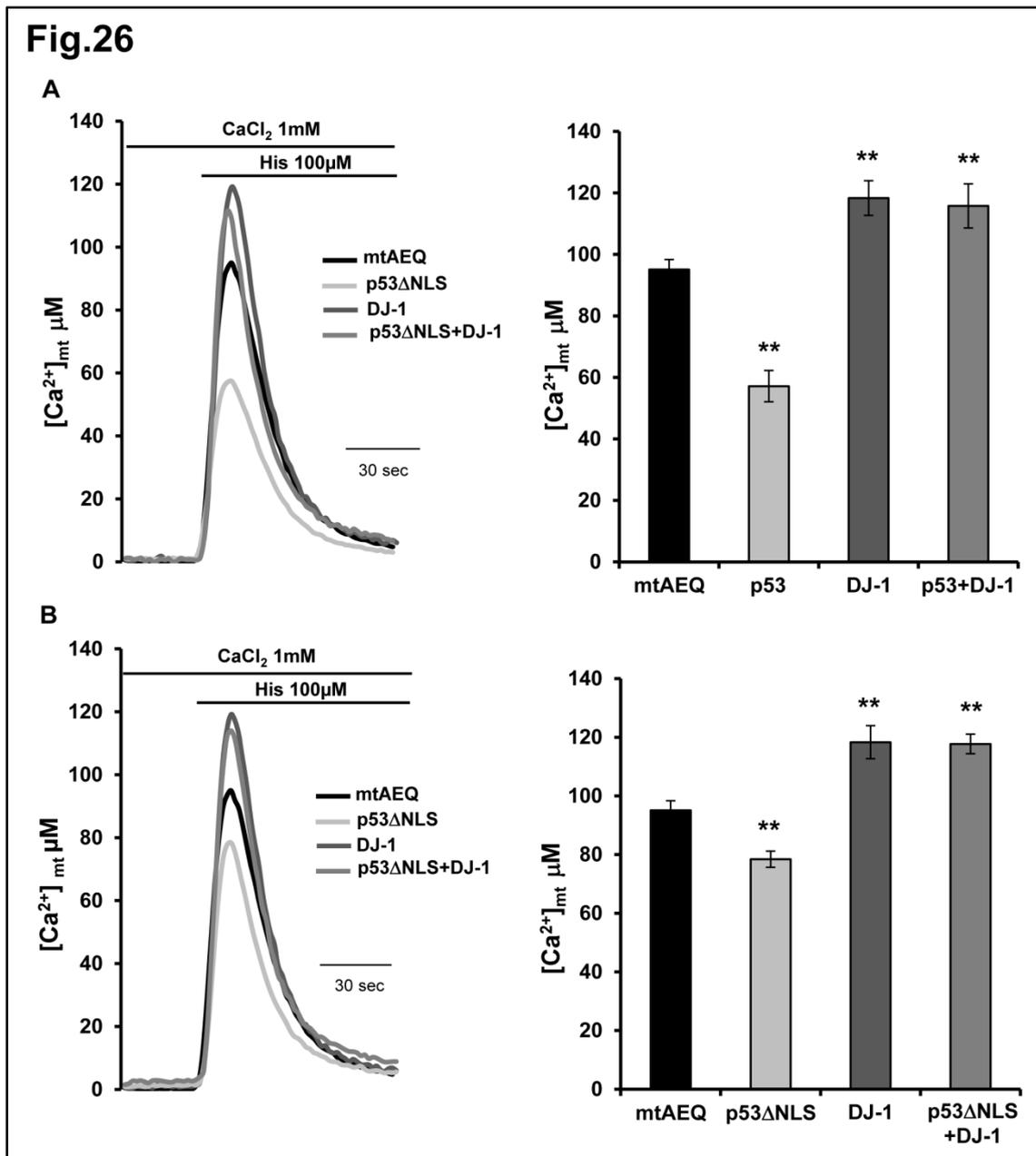
2.4.3 Analisi degli effetti della co-transfezione di DJ-1 in cellule HeLa sovraesprimenti p53 e p53ΔNLS sui transienti mitocondriali di Ca²⁺.

Per indagare la relazione di DJ-1 e p53 nel controllo dell'omeostasi del Ca²⁺ abbiamo co-espresso le due proteine in cellule HeLa insieme alla sonda mtAEQ e misurato i transienti di Ca²⁺ mitocondriali generati in seguito alla stimolazione cellulare. Com'è possibile vedere in Figura 26A, la sovraespressione di DJ-1 è in grado di contrastare e annullare gli effetti di p53: i livelli di Ca²⁺ mitocondriale risultano infatti significativamente più alti rispetto alle cellule di controllo, e simili a quelli misurati nelle cellule che sovraesprimono solamente DJ-1. Lo stesso effetto “dominante” di DJ-1 è apprezzabile anche nel caso di co-transfezione con il mutante p53ΔNLS (Figura 26B).

Figura 28

La sovraespressione di DJ-1 è in grado di revertire il fenotipo ottenuto sui transienti di Ca²⁺ mitocondriali dall'espressione di p53 e p53ΔNLS.

Le cellule HeLa sono state cotransfettate con la sonda mtAEQ e con il plasmide vuoto o con le proteine di nostro interesse. In figura sono presentate le tracce rappresentative di un esperimento e gli istogrammi con la media dei valori ottenuti (n>7). Nel pannello (A) è mostrato l'effetto di DJ-1 nelle cellule transfettate con p53, e in (B) l'effetto di DJ-1 in quelle transfettate con p53ΔNLS.



2.4.4 Analisi della morfologia mitocondriale in cellule che sovraesprimono p53 e p53ΔNLS in assenza o in presenza di sovraespressione di DJ-1.

Per meglio comprendere e interpretare i risultati ottenuti abbiamo analizzato la morfologia mitocondriale in cellule HeLa sovraesprimenti la sonda mtRFP e p53 o p53ΔNLS in assenza o in presenza di sovraespressione di DJ-1. La Figura 27 mostra la quantificazione in termini percentuali del numero di cellule con i mitocondri frammentati nelle diverse condizioni sperimentali: come dimostrato in precedenza, la sovraespressione di DJ-1 non modifica la morfologia dei mitocondri, mentre la sovraespressione di p53 e di p53ΔNLS provoca un ri-arrangiamento del reticolo

mitocondriale: si osserva infatti un evidente un aumento di cellule con i mitocondri frammentati. E' interessante notare come la co-espressione di DJ-1 insieme a p53 o a p53 Δ NLS annulli gli effetti di quest'ultima proteina, riportando il numero di cellule con mitocondri frammentati simili a quelle presenti nel controllo, analogamente a quanto osservato per quanto riguarda gli effetti sull'omeostasi mitocondriale del Ca²⁺.

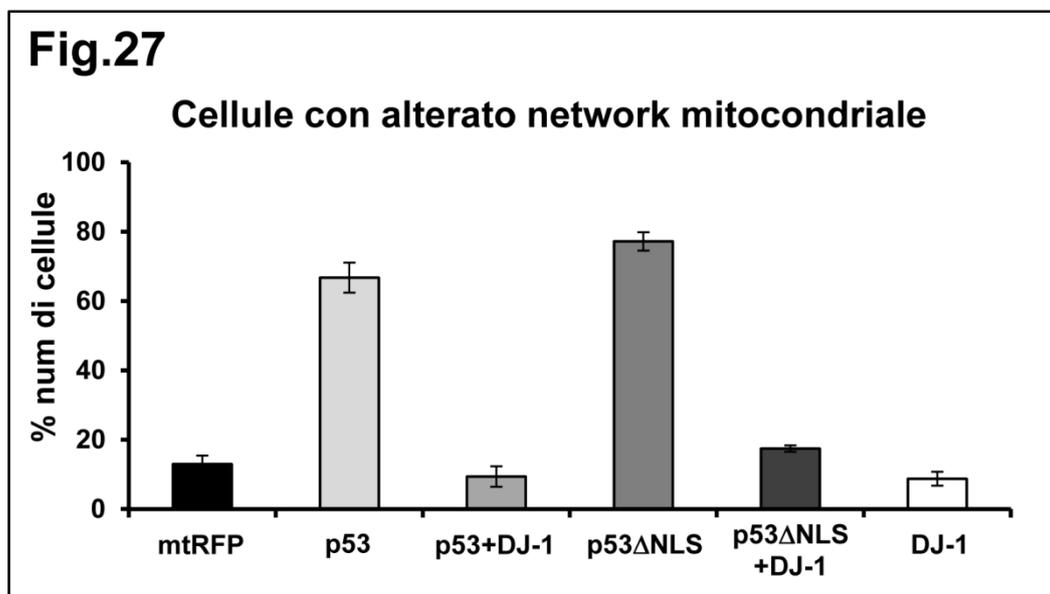


Figura 27

Rappresentazione percentuale del numero di cellule con i mitocondri alterati sovraesprimendo le proteine di nostro interesse.

Le cellule HeLa sono state transfettate con le proteine descritte in figura e la sonda mtRFP. In seguito sono state sottoposte ad analisi d'immunocitochimica per visualizzare DJ-1 e p53 o p53 Δ NLS. Le cellule con una morfologia mitocondriale alterata sono state contate, e rapportate al totale di cellule positive per la transfezione, in quattro campi diversi per ogni vetrino (l'esperimento è stato ripetuto tre volte, analizzando 5 campi diversi per ogni esperimento).

Abbiamo ipotizzato che p53, alterando la morfologia del network mitocondriale, potesse indurre una differenza nei siti di contatto tra mitocondri e RE, e abbiamo quindi analizzato questo parametro anche nelle cellule che sovraesprimono p53. La Figura 28A mostra le ricostruzioni tridimensionali dei due organelli e come si può notare le regioni di sovrapposizione del segnale delle erGFP e della mtRFP risultano ridotte nelle cellule che sovraesprimono p53 rispetto alle cellule di controllo. Il calcolo dei valori del coefficiente di Manders nelle diverse condizioni sperimentali ha confermato una riduzione delle regioni di co-localizzazione nelle cellule positive per p53 (Figura 28B).

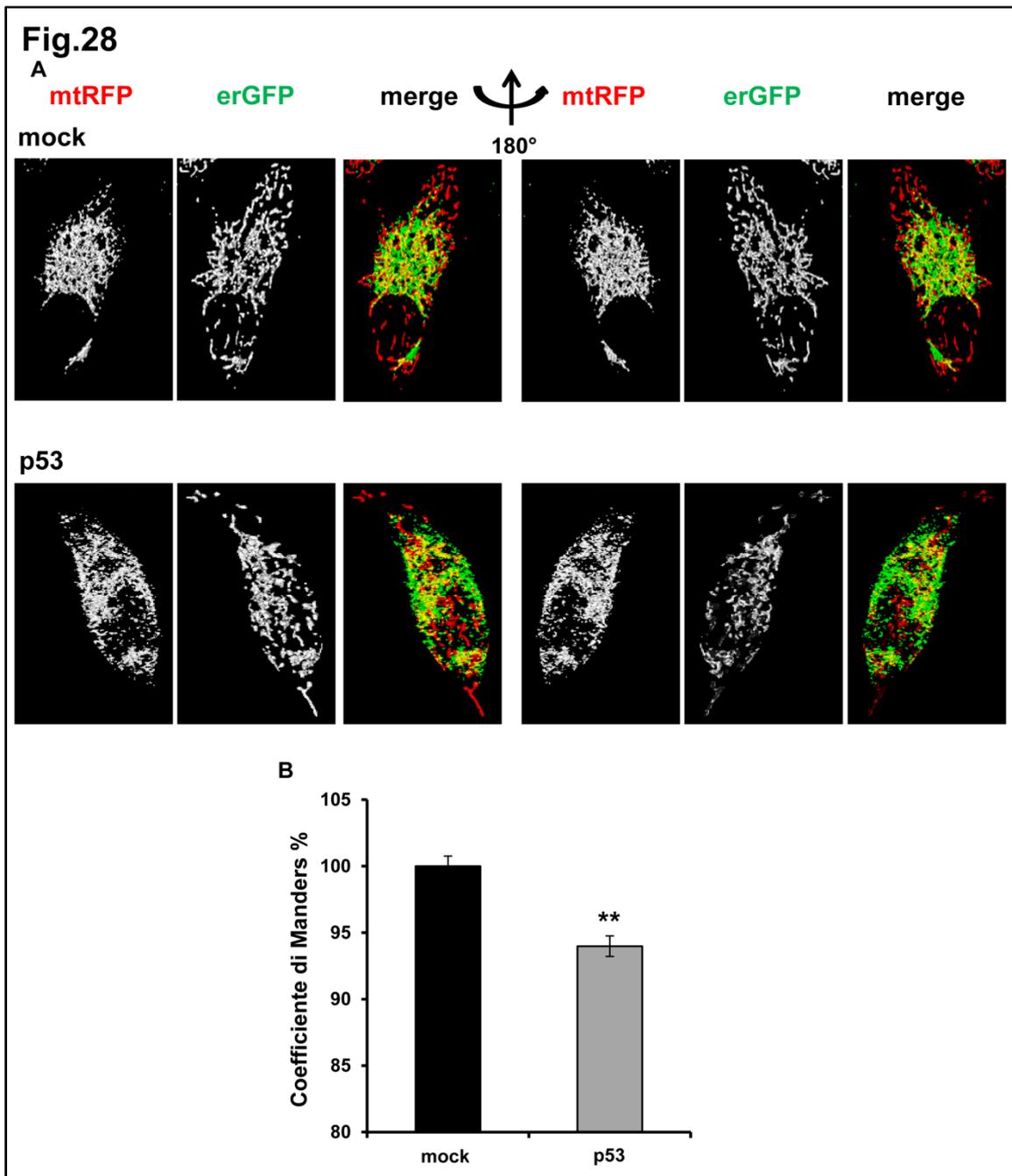


Figura 28

La sovraespressione di DJ-1 ristabilisce i siti di contatto tra mitocondri e RE alterati dall'espressione di p53.

In (A) è presentata la ricostruzione tridimensionale dei mitocondri e del RE in cellule HeLa sovraesprimenti mtRFP ed erGFP con il plasmide vuoto o con le proteine di nostro interesse. Le cellule sono state eccitate separatamente a 488nm o 543nm e le immagini sono state acquisite al microscopio confocale. Il merge delle immagini è mostrato per ogni condizione. Il colore giallo indica l'area di contatto tra i due organelli. Gli stack sono stati acquisiti ogni 0,2 μ m lungo l'asse z (per un totale di 40 immagini) con un obiettivo 63X. come precedentemente descritto con un microscopio confocale Leica SP5 e elaborando le immagini con ImageJ. In (B) gli istogrammi rappresentano il valore del coefficiente di Manders ottenuto utilizzando il software ImageJ (mock n= 11; p53 n=19).

2.4.5 Analisi del taglio di PARP in cellule HeLa sovraesprimenti p53 in assenza o in presenza di sovraespressione di DJ-1.

Considerata la capacità di DJ-1 di recuperare sia la morfologia che la fisiologia mitocondriale compromesse nelle cellule che sovraesprimono p53, abbiamo condotto una prima analisi preliminare per valutare se DJ-1 potesse esercitare il suo effetto protettivo anti-apoptotico.

Abbiamo indotto apoptosi in cellule HeLa con un trattamento di 5 ore con staurosporina (STS) e monitorato il taglio proteolitico della proteina Poli ADP-Ribosio Polimerasi (PARP). In seguito all'attivazione dell'apoptosi, la proteina PARP dal peso molecolare di 116kDa, viene tagliata dalla caspasi 3, producendo due frammenti, uno pari a 85kDa e uno pari a 25kDa. Abbiamo quindi eseguito un Western blot sugli estratti proteici di HeLa, per visualizzare l'attivazione o meno della via apoptotica e se DJ-1 potesse o meno annullare gli effetti di proapoptotici di p53. Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato un anticorpo in grado di riconoscere solamente la forma tagliata di PARP pari a 85kDa. Come mostrato in Figura 29 nelle corsie corrispondenti alle cellule trattate con STS si osserva un aumento consistente del frammento di 85 kDa, la cui intensità viene ridotta dalla co-espressione di DJ-1 come si può notare nelle corsie corrispondenti.

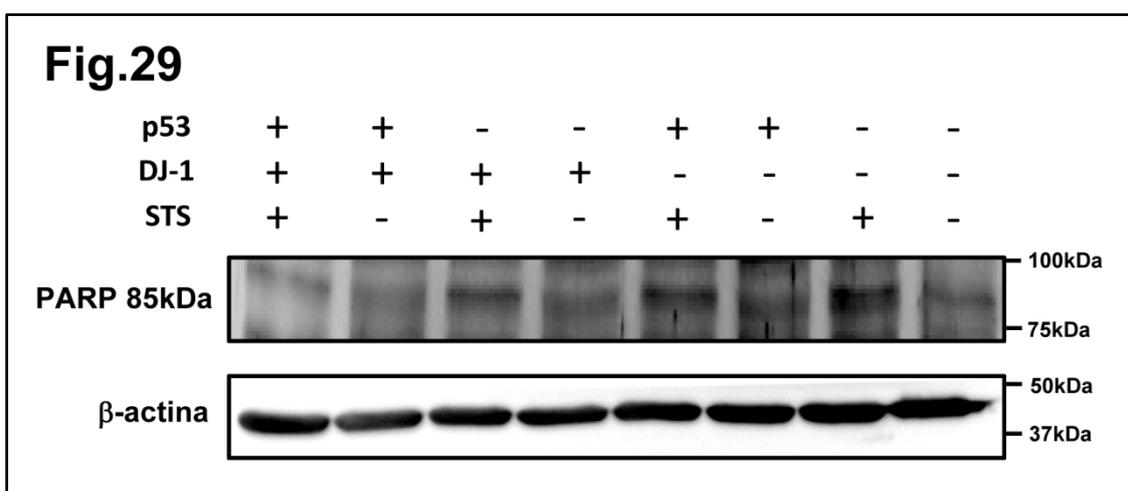


Figura 29

Analisi dei livelli della forma troncata (85kDa) di PARP come indicatore dell'attivazione dell'apoptosi in cellule sovraesprimenti p53 o p53 Δ NLS e p53 o p53 Δ NLS con DJ-1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con il plasmide vuoto o con le proteine di nostro interesse. La transfezione è stata eseguita in doppio e uno dei due campioni ripetuti è stato trattato con staurosporina per indurre l'apoptosi. In figura è mostrato il Western blot dei lisati cellulari totali, in cui è stata analizzata la quantità di espressione di PARP 85kDa come marker dei livelli di attivazione dell'apoptosi (n=1).

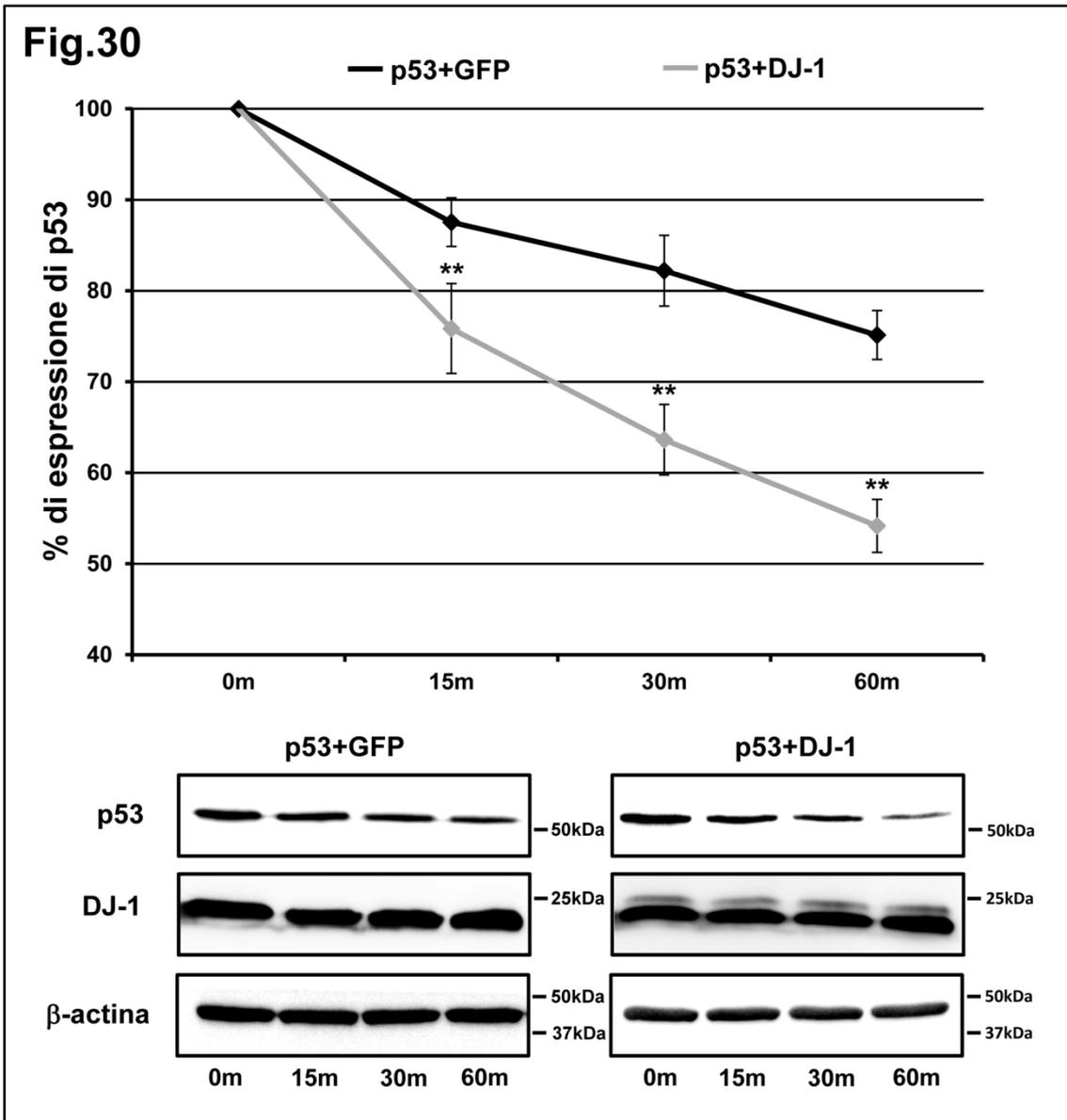
2.4.6 Analisi della degradazione di p53 in presenza o meno di DJ-1.

L'ultimo aspetto che abbiamo voluto considerare per caratterizzare l'azione di DJ-1 nei confronti di p53 stata la possibilità che DJ-1 avesse un effetto sulla emivita della proteina p53. Per verificare questa possibilità abbiamo quindi allestito un esperimento di "cicloesimide chase". Le cellule HeLa co-transfettate con i plasmidi di espressione per p53 e per la proteina GFP (come controllo) o, in alternativa per DJ-1, sono state incubate per tempi diversi (0-15-30-60 min) con l'inibitore della sintesi proteica cicloesimide. La velocità di degradazione di p53 è stata analizzata in saggi di Western blot condotti a tempi diversi dal trattamento. Il grafico illustrato nella Figura 30 mostra la cinetica di degradazione della proteina p53: la quantità di p53 dopo i diversi minuti di trattamento con cicloesimide nelle due condizioni di transfezione è espressa in termini percentuali. Com'è possibile vedere, la sovraespressione di DJ-1 aumenta in maniera significativa la velocità con cui p53 viene degradata dalla cellula.

Figura 33

L'espressione di DJ-1 induce una maggiore velocità di degradazione di p53 in cellule HeLa.

Le cellule HeLa sono state transfettate con p53 insieme a una GFP citosolica come controllo o insieme a DJ-1 e sottoposte al saggio di cicloesimide-chase. In seguito sono state sottoposte a trattamento con cicloesimide per bloccare la sintesi delle proteine a diverse tempistiche. In figura è presentato il grafico con la quantificazione percentuale dell'espressione di p53 nelle diverse condizioni (ottenuta utilizzando il software ImageJ) (n>5). In basso sono mostrati i risultati rappresentativi di un esperimento di Western blot per le proteine indicate.



2.5 Analisi degli effetti della sovraespressione o del silenziamento della proteina PINK1 in cellule HeLa.

Analogamente a quanto già descritto per le proteine α -sin, parkina e DJ-1 abbiamo studiato anche gli effetti della sovraespressione o del silenziamento della proteina PINK1. Abbiamo deciso di presentare e di discutere i risultati ottenuti in un paragrafo a parte considerata la loro peculiarità.

2.5.1 Analisi degli effetti della sovraespressione di PINK1 sull'omeostasi del Ca^{2+} in cellule HeLa.

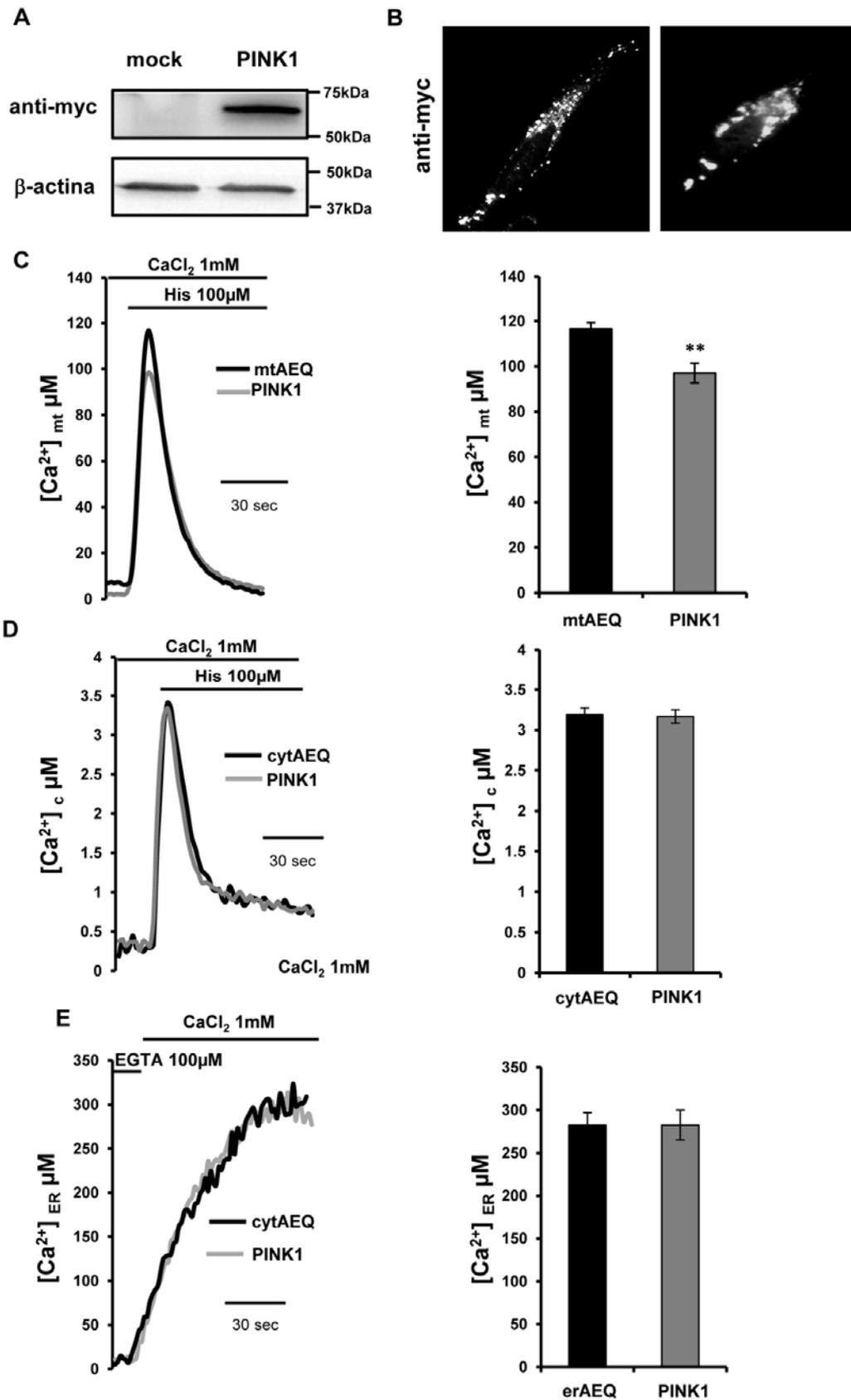
Le cellule HeLa sono state transfettate con un costrutto che codifica la proteina PINK1 fusa all'epitopo immunogenico c-myc fuso alla sua estremità N-terminale, creando così la proteina myc-PINK1, qui di seguito chiamata PINK1. Com'è possibile vedere in Figura 31A, il Western blot ottenuto da cellule HeLa sovraesprimenti PINK1 e sviluppato con l'anticorpo anti-myc, mostra una singola banda di peso molecolare inferiore ai 70kDa, che corrisponde alla forma "full-length", non processata, di PINK1, dal peso molecolare di circa 65kDa per l'aggiunta del tag myc. È infatti noto dalla letteratura che PINK1 appare sotto forma di due bande, in alcune condizioni anche tre, di peso molecolare di 63kDa, 52kDa e 45kDa, rispettivamente, che derivano dal processamento della forma "full-length" che prevede uno o più tagli proteolitici all'estremità N-terminale. Durante questi tagli il tag myc verrebbe quindi perso, rendendo impossibile la visualizzazione delle due bande a peso molecolare inferiore. L'analisi immunocitochimica effettuata in cellule HeLa utilizzando un anticorpo primario anti-myc, ci ha permesso di notare non solo la localizzazione di PINK1 esclusivamente mitocondriale, ma anche che i mitocondri positivi alla colorazione con l'anticorpo possiedono una morfologia compromessa in quanto presentano un aspetto decisamente frammentato (Figura 31B). Abbiamo quindi misurato i transienti mitocondriali di Ca^{2+} coesprimendo nelle cellule che esprimono PINK1 anche la sonda mtAEQ. Come si può notare dalla Figura 31C, e come ci si poteva aspettare dalla morfologia mitocondriale compromessa, i valori medi dell'ampiezza dei picchi dei transienti di Ca^{2+} sono significativamente ridotti nelle cellule che esprimono PINK1. Anche in questo caso abbiamo analizzato i livelli dello ione Ca^{2+} negli altri due compartimenti: il citoplasma ed il RE. Com'è possibile vedere in Figura 31D la sovraespressione di PINK1 non altera i transienti di Ca^{2+} citosolico, e nemmeno è in grado di modificare i livelli dello ione nel RE (Figura 31E). E' quindi plausibile pensare che l'alterazione dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali osservata possa dipendere da un effetto diretto della proteina su mitocondri stessi, senza la compromissione degli altri meccanismi di regolazione del Ca^{2+} all'interno della cellula.

Figura 31

Caratterizzazione dell'espressione di PINK1 in cellule HeLa e analisi dell'omeostasi di Ca^{2+} cellulare nelle stesse cellule.

In (A) e (B) rispettivamente sono presentati i saggi di Western blot e d'immunocitochimica di cellule HeLa transfettate con PINK1 o con il plasmide vuoto di controllo. Per gli esperimenti è stato utilizzato un anticorpo anti-myc in grado di riconoscere l'epitopo immunogenico presente all'N-terminale della proteina transfettata. In (B) le cellule HeLa sono state transfettate con la sonda mtAEQ o cytAEQ o erAEQ e il plasmide vuoto o con PINK1 e in seguito sottoposte alla misura della concentrazione di Ca^{2+} nei diversi compartimenti cellulari come descritto in precedenza ($n > 8$ per i mitocondri; $n > 14$ per il citosol; $n > 10$ per il RE).

Fig.31



È noto dalla letteratura che PINK1, una volta che è importata nei mitocondri, viene processata e rilasciata nel citoplasma o rapidamente degradata, per garantire a livello delle membrane mitocondriali la presenza di quantità ridotte di proteina. Un accumulo di PINK1 nei mitocondri, infatti, di conseguenza per esempio al trattamento con sostanze che inducono depolarizzazione mitocondriale, da origine all'attivazione del processo di mitofagia che porta all'eliminazione selettiva dei mitocondri danneggiati. Abbiamo quindi ipotizzato che l'alterata morfologia mitocondriale osservata in seguito alla sovraespressione di PINK1 fosse dovuta ad un accumulo eccessivo di PINK1 a livello delle membrane mitocondriali dell'organello. Per verificare questa possibilità abbiamo allestito un esperimento di "time-course", in cui siamo andati a misurare i transienti di Ca^{2+} mitocondriale a diversi tempi dalla transfezione, cercando di vedere se l'accumulo progressivo della proteina portasse ad un'alterazione dei mitocondri o della loro funzionalità. La Figura 32A riassume i risultati ottenuti: gli istogrammi rappresentano i valori medi dei picchi ottenuti utilizzando cellule HeLa in cui è stata sovraespressa la sonda mtAEQ insieme al plasmide di controllo o a quello che codifica PINK1. Le misure sono state effettuate a 4, 8, 12, 16 ore dalla transfezione. Come si può notare a 4 ore dalla transfezione i transienti di Ca^{2+} mitocondriale risultano significativamente aumentati conseguentemente alla sovraespressione di PINK1 (in analogia a quanto osservato in seguito alla sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1), ad 8 ore non è apprezzabile alcun effetto, mentre a partire da 12 ore dalla transfezione si osserva una riduzione. Oltre a valutare i transienti di Ca^{2+} mitocondriale, durante il "time-course" sono state acquisite anche le immagini dell'analisi immunocitochimica condotta utilizzando un anticorpo primario che riconosce l'epitopo HA fuso alla sequenza della sonda mtAEQ, allo scopo di valutare la morfologia mitocondriale (Figura 32B). Com'è possibile notare, all'aumentare del tempo dalla transfezione, la morfologia dei mitocondri delle cellule sovraesprimenti PINK1 diventa via via sempre più compromessa, ed i mitocondri appaiono sempre più frammentati fino ad apparire di aspetto quasi puntiforme dopo 16 ore, che corrispondono alle condizioni degli esperimenti di Figura 31. Sorprendentemente, dopo 4 ore dalla transfezione invece, gli organelli risultano avere una morfologia simile a quella delle cellule di controllo, e, come già notato, i transienti di Ca^{2+} mitocondriale risultano essere significativamente più elevati rispetto a quelli misurati nelle cellule di controllo. Questo esperimento ci ha così dato una prima indicazione sulla possibilità che un eccessivo accumulo di PINK1 possa portare a un'alterazione della morfologia mitocondriale con compromissione del segnale Ca^{2+} . A sostegno di questa ipotesi abbiamo controllato i livelli di espressione di PINK1 a 4 e a 16 ore dalla transfezione e come si può notare dal Western blot di Figura 32C, la proteina risulta più abbondante dopo 16 ore di transfezione.

Fig.32

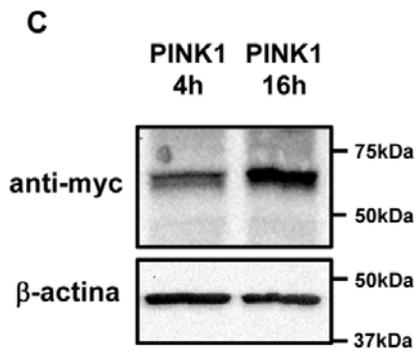
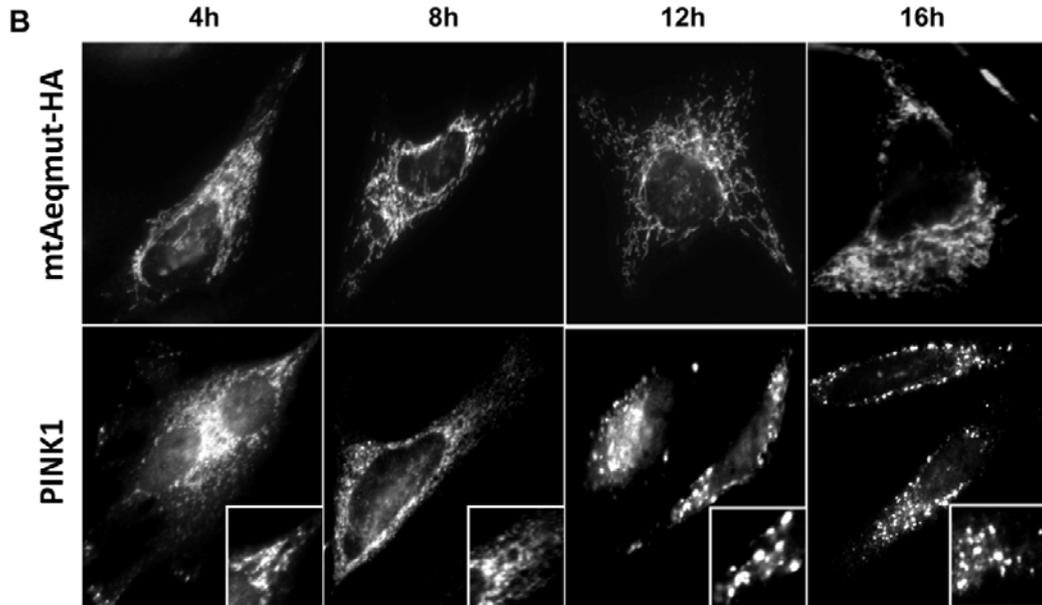
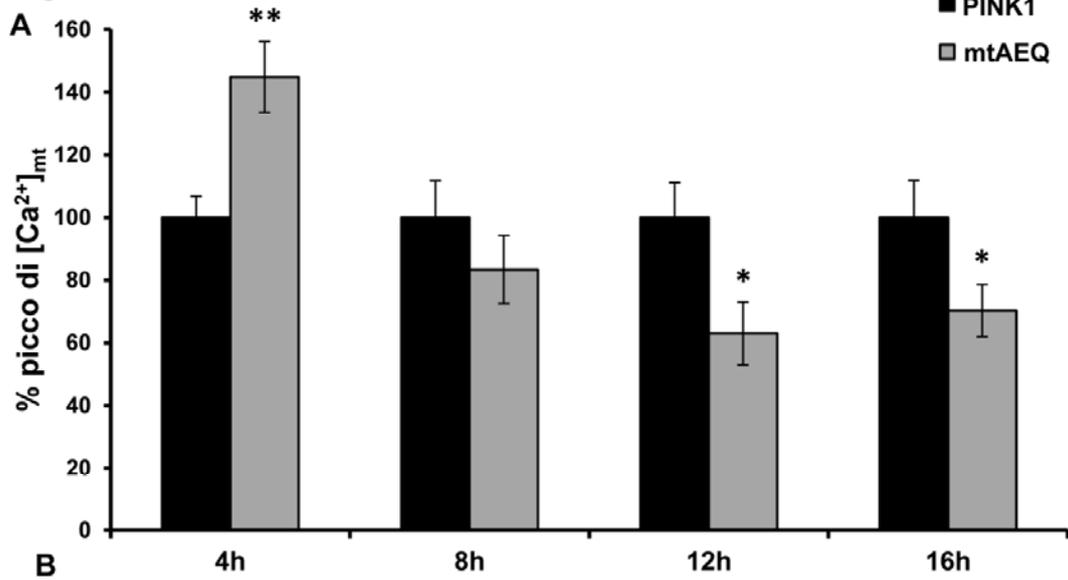


Figura 32

Esperimento di time-course per analizzare gli effetti dell'accumulo di PINK1 sui transienti di Ca^{2+} mitocondriali e sulla morfologia degli organelli.

Le cellule HeLa sono state transfettate con la sonda mtAEQ e il plasmide vuoto di controllo o con PINK1. L'analisi dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali (A) e l'immunocitochimica (B) è stata effettuata a diverse tempistiche come indicato ($n > 7$). Per l'analisi della morfologia mitocondriale è stato utilizzato l'anticorpo anti-HA in grado di riconoscere il tag immunogeno presente nella sonda mtAEQ. In (C) è presente un Western blot che analizza i livelli di espressione di PINK1 utilizzando un anticorpo anti-myc in cellule HeLa dopo 4 e 16 ore dalla transfezione.

Per caratterizzare meglio le alterazioni mitocondriali abbiamo misurato il potenziale di membrana mitocondriale con TMRM come precedentemente descritto. Anche in questo caso abbiamo deciso di effettuare la misura a 4 e a 16 ore dalla transfezione, in modo da paragonare come l'accumulo della proteina potesse avere effetti sul potenziale di membrana. Come mostrato nella Figura 33, la sovraespressione di PINK1 dopo 4 ore dalla transfezione, non ha effetti significativi, infatti la differenza di fluorescenza misurata nei due batch di cellule prima e dopo l'applicazione del disaccoppiante, risulta praticamente uguale. A 16 ore invece, le cellule sovraesprimenti PINK1, in cui la morfologia mitocondriale appare decisamente alterata, presentano un crollo significativo del potenziale di membrana, pari a circa la metà di quello delle cellule di controllo. Il presente esperimento ci suggerisce quindi una possibile spiegazione del motivo per cui a 16 ore i mitocondri delle cellule sovraesprimenti PINK1 abbiano una ridotta capacità di accumulare Ca^{2+} . Resta comunque da capire se la perdita del potenziale di membrana, e quindi il difetto nell'accumulare Ca^{2+} , sia la causa o piuttosto la conseguenza dell'alterata morfologia mitocondriale. Quest'apparente duplice meccanismo di azione di PINK1 necessita di ulteriori approfondimenti, così come l'osservazione che a 4 ore dalla transfezione i mitocondri accumulano Ca^{2+} più efficientemente, nonostante il potenziale di membrana sia invariato.

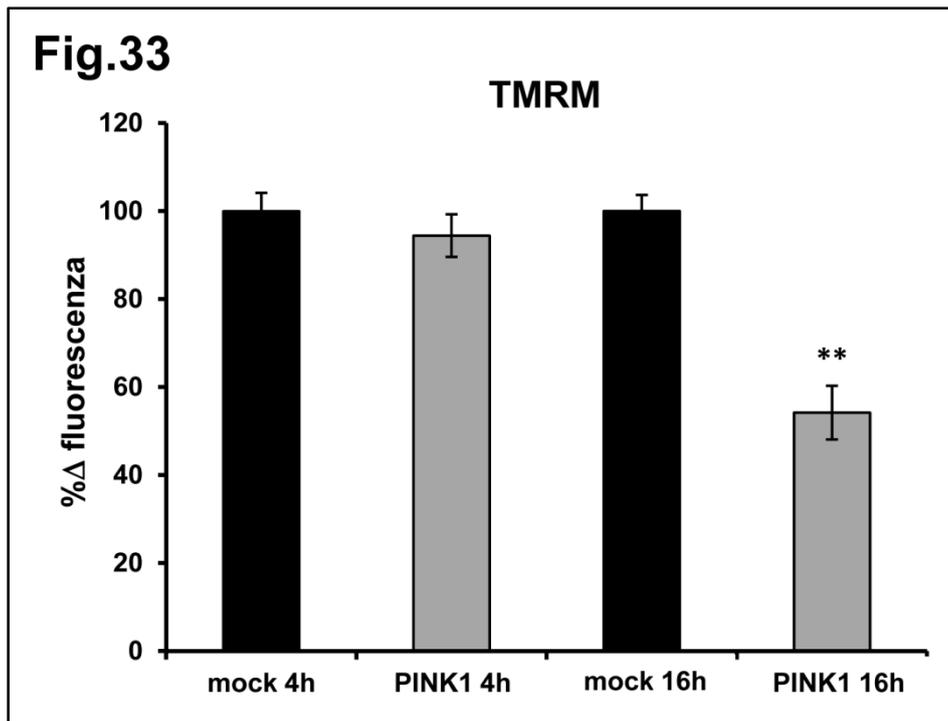


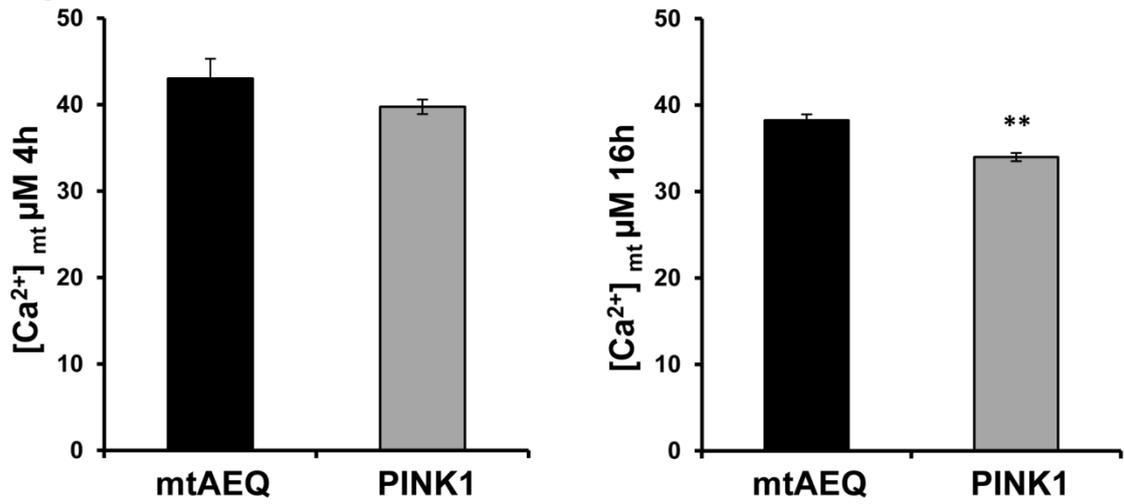
Figura 33

Analisi degli effetti di PINK1 sul potenziale di membrana mitocondriale.

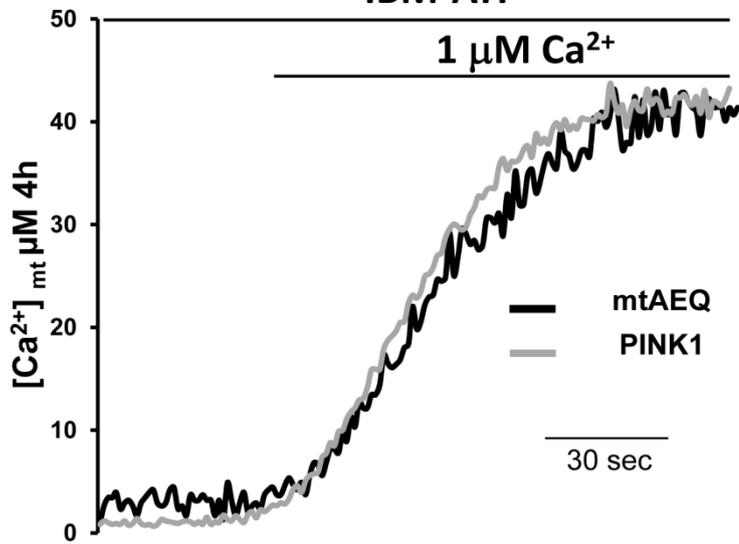
Le cellule HeLa sono state transfettate con PINK1 e sottoposte all'analisi TMRM come descritto in precedenza dopo 4 e dopo 16 ore dalla transfezione. In figura gli istogrammi riportano i valori di fluorescenza percentuali medi ottenuti nei diversi esperimenti sottraendo la fluorescenza residua dopo trattamento con disaccoppiante FCCP, alla fluorescenza emessa dalle cellule nel periodo pre-trattamento (n>40 cellule in tre diversi esperimenti).

Il passo successivo è stato quello di analizzare, in cellule permeabilizzate, la capacità dei mitocondri di accumulare Ca^{2+} nelle cellule con PINK1 sovraespresso. Come descritto in precedenza, abbiamo transfettato le cellule HeLa con la sonda mtAEQ con il plasmide di controllo o con PINK1, e siamo andati a misurare l'accumulo di Ca^{2+} negli organelli esponendo le cellule permeabilizzate ad una concentrazioni di Ca^{2+} pari a 1 μM , secondo il protocollo sperimentale descritto nella sezione Materiali e Metodi. Anche in questo caso le misure sono state effettuate a 4 e 16 ore. Come mostrato in Figura 34, a 4 h la sovraespressione di PINK1 non causa effetti sulla capacità dei mitocondri di accumulare Ca^{2+} , in linea col dato ottenuto dal saggio col TMRM; a 16 ore invece, riduce la capacità dei mitocondri di accumulare Ca^{2+} in cellule permeabilizzate in accordo con i dati che indicano un calo della differenza del potenziale di membrana e con le misure di Ca^{2+} condotte in cellule intatte.

Fig.34



IBM-ATP



IBM-ATP

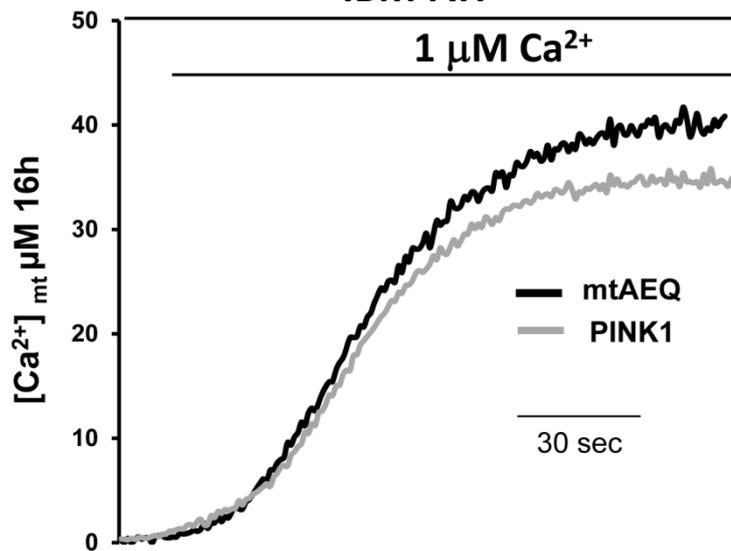


Figura 34

Analisi della concentrazione di Ca^{2+} mitocondriale in cellule HeLa permeabilizzate sovraesprimenti PINK1.

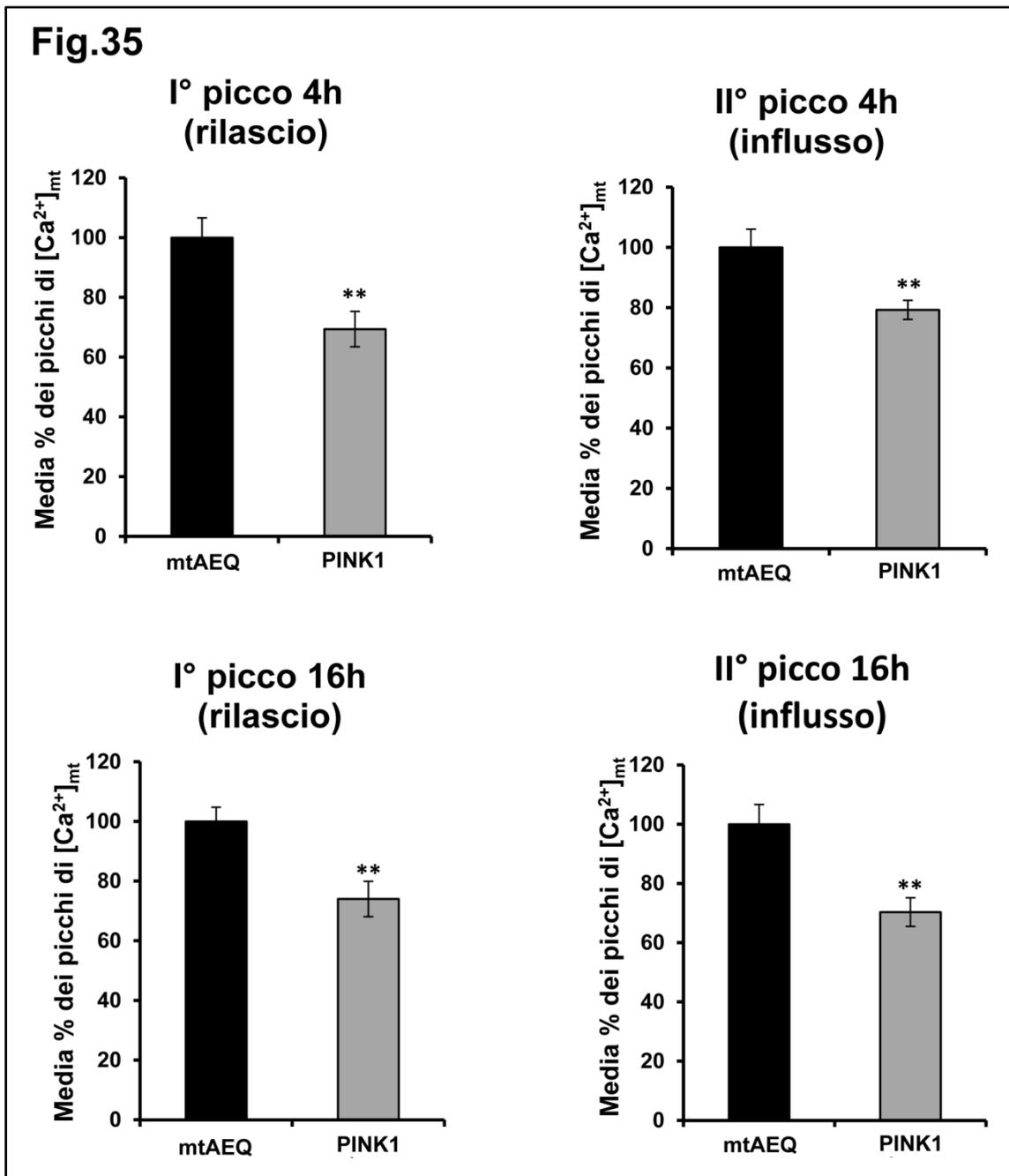
Le cellule HeLa sono state transfettate con la sonda mtAEQ e il plasmide vuoto o con PINK1. La misura della concentrazione di Ca^{2+} mitocondriale dopo permeabilizzazione e perfusione con una soluzione contenente Ca^{2+} 1 μM tamponato è stata effettuata come precedentemente descritto a 4 e 16 ore dopo la transfezione. In (A) sono mostrati gli istogrammi con la media dei valori ottenuti ($n > 7$) e in (B) sono presenti i grafici rappresentativi di un esperimento.

Anche nel caso della sovraespressione di PINK1, come per α -sin, parkina e DJ-1, abbiamo analizzato il contributo della mobilitazione di Ca^{2+} dai depositi cellulari ed il contributo dell'influsso dall'ambiente extracellulare nella generazione dei transienti di Ca^{2+} nei mitocondri in seguito alla stimolazione. Anche in questo caso l'analisi è stata condotta a 4 e a 16 ore dalla transfezione. La Figura 35 mostra i risultati ottenuti: la sovraespressione di PINK1 è in grado di ridurre in maniera significativa entrambi i picchi, a suggerire (insieme agli esperimenti condotti in cellule permeabilizzate) che gli effetti osservati sui transienti mitocondriali di Ca^{2+} in seguito alla sovraespressione di PINK1, a differenza di quanto proposto nel caso di α -sin, parkina e DJ-1, non dipendano da un effetto di PINK1 sulle interazioni RE-mitocondri, ma piuttosto da un effetto di PINK1 sui sistemi di trasporto del Ca^{2+} mitocondriali. Con nostra sorpresa però, l'effetto è visibile sia a 4 che a 16 ore. Il dato a 4 ore contrasta con quello ottenuto in cellule intatte dove infatti si osserva un aumento dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali in seguito a stimolo. La situazione quindi ha bisogno di ulteriori indagini sperimentali.

Figura 35

Analisi del contributo del rilascio di Ca^{2+} dal RE e dell'influsso del Ca^{2+} dallo spazio extracellulare alla concentrazione di Ca^{2+} mitocondriale nelle cellule sovraesprimenti PINK1.

Le cellule HeLa sono state transfettate con la sonda mtAEQ e il plasmide vuoto o con PINK1. Dopo 4 e 16 ore dalla transfezione sono state analizzate, come precedentemente descritto, per misurare il contributo del Ca^{2+} mobilitato dal RE e del Ca^{2+} proveniente dall'influsso extracellulare ai transienti dello ione nei mitocondri. Gli istogrammi rappresentano la media dei valori percentuali ottenuti ($n > 10$).



2.5.2 Analisi degli effetti del silenziamento di PINK1 sull'omeostasi del Ca^{2+} .

Per ottenere nuove informazioni abbiamo deciso di provare a sottoregolare i livelli di espressione di PINK1 mediante trattamento con siRNA specifici disponibili commercialmente. Inoltre per indagare meglio questi effetti abbiamo deciso di utilizzare un nuovo anticorpo primario, in grado di evidenziare sia la forma “full-length” di 63 kDa che la forma troncata di 53 kDa di PINK1. In Figura 36A è mostrata un'analisi di Western blot in cui è analizzato l'effetto del siRNA sulla proteina sovraespressa in cellule HeLa per verificarne l'efficacia del siRNA. Come si può notare da

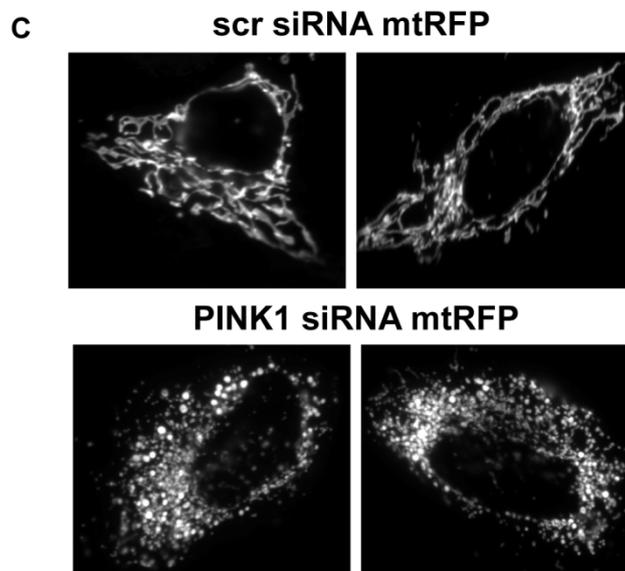
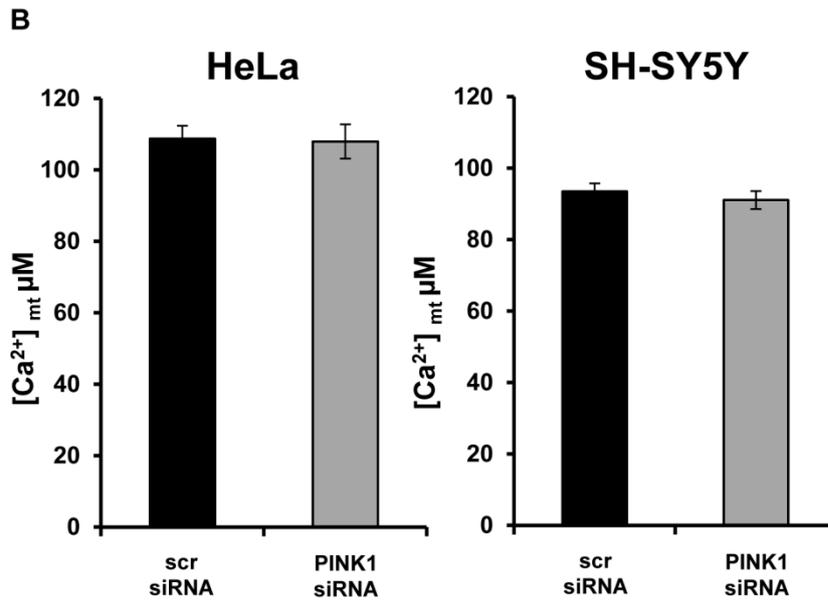
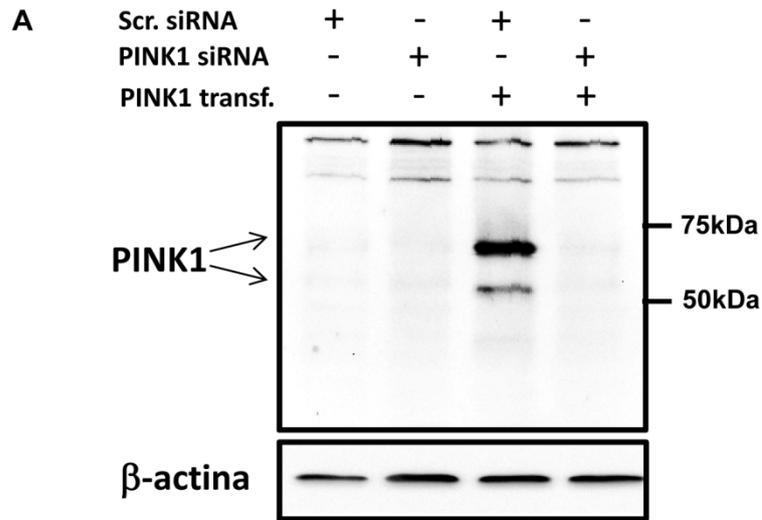
questo Western blot i livelli di PINK1 endogeno sono scarsamente rivelabili da questo anticorpo, tuttavia è chiaramente visibile che il trattamento con siRNA abolisce l'espressione esogena di PINK1 in cellule HeLa. Per quanto riguarda l'analisi dell'omeostasi del Ca^{2+} , abbiamo comunque deciso di analizzare gli effetti del silenziamento sulla proteina endogena sia in cellule HeLa che in cellule SH-SY5Y, e come si può vedere in Figura 36B non abbiamo osservato alcun effetto sui transienti di Ca^{2+} mitocondriali, in quanto i picchi dei transienti risultano identici a quelli delle cellule di controllo trattate con siRNA aspecifici (scr). Siamo andati quindi ad analizzare la morfologia mitocondriale, sovraesprimendo la sonda mtRFP in cellule HeLa trattate con i siRNA di controllo o contro PINK1. Come mostrato dalla Figura 36C, nelle cellule silenziate la morfologia mitocondriale risulta alterata con un significativo aumento della frammentazione rispetto alle cellule di controllo. Resta da capire se questo effetto possa dipendere dalla riduzione dei livelli endogeni di PINK1 che al momento non siamo ancora riusciti ad apprezzare. Appare evidente che ulteriori esperimenti in questa direzione vanno effettuati per chiarire questo quadro al momento ancora preliminare.

Figura 36

Effetti della sotto-regolazione di PINK1 sui transienti di Ca^{2+} mitocondriali e sulla morfologia degli organelli.

In (A) è presentato il Western blot in cui è stata analizzata l'efficacia del trattamento con i siRNA contro PINK1 in seguito alla sua transfezione in cellule HeLa. In (B) gli istogrammi rappresentano la media dei transienti di Ca^{2+} ottenuti in cellule HeLa e cellule SH-SY 5Y ($n > 7$) in seguito al trattamento con siRNA contro PINK1. Le immagini invece si riferiscono alla morfologia dei mitocondri di cellule HeLa transfettate con mtRFP e sottoposte a immunocitochimica in seguito al trattamento con siRNA di controllo (scr) o contro PINK1.

Fig.36



2.5.3 Analisi degli effetti della sovraespressione di PINK1 sulla produzione di ATP mitocondriale in cellule HeLa.

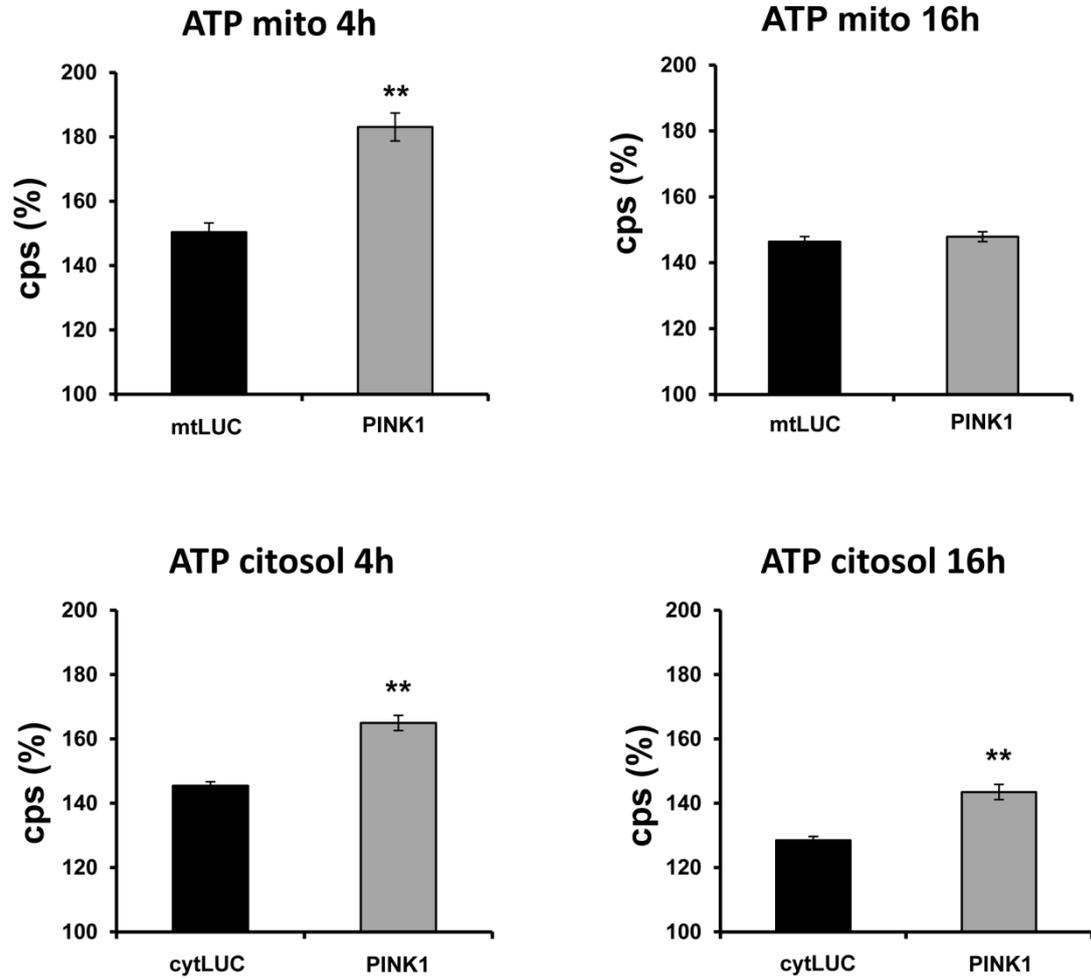
Anche per quanto riguarda PINK1, siamo andati ad analizzare la possibilità che la sua sovraespressione, sia a 4 che a 16 ore, potesse indurre effetti sulla produzione di ATP nella cellula in seguito a stimolo accoppiato alla mobilizzazione di Ca^{2+} . La misura di questo parametro è stata effettuata come descritto in precedenza in cellule HeLa transfettate con le sonde mtLUC e cytLUC. Com'è possibile vedere dagli istogrammi riportati in Figura 37, la sovraespressione di PINK1 a 4 ore dalla transfezione è in grado di indurre un significativo aumento della produzione di ATP sia mitocondriale che citosolico. A 16 ore dopo la transfezione, invece, situazione in cui i transienti di Ca^{2+} mitocondriale e il potenziale di membrana mitocondriale risultano significativamente ridotti, non si osserva un effetto di PINK1 sui livelli di ATP mitocondriale, ma un incremento dei livelli citosolici. Il significato di questi risultati resta da chiarire, anche alla luce del fatto che diversi articoli presenti in letteratura riportano come PINK1 sia indispensabile per l'attività del complesso I della catena respiratoria (Gautier et al., 2008; Morais et al., 2009). Quindi oltre alla modulazione da Ca^{2+} , probabilmente intervengono altri elementi che mediano l'azione di PINK1 sul metabolismo energetico.

Figura 40

Analisi degli effetti della sovraespressione di PINK1 sulla produzione di ATP mitocondriale e citosolica in seguito a stimolazione InsP3-mediata.

Le cellule HeLa sono state transfettate con le sonde mtLUC o cytLUC e con il plasmide di controllo o con PINK1 e sottoposte alla misura della produzione di ATP come descritto in precedenza dopo 4 e 16 ore dalla transfezione. Gli istogrammi mostrano la media dei valori percentuali della differenza di emissione di luce prima e dopo stimolo InsP3-mediato ottenuti nei diversi esperimenti ($n > 10$).

Fig.37



3. DISCUSSIONE

Fin dai primissimi studi effettuati per indagare la patogenesi delle malattie neurodegenerative e capire la causa della morte dei neuroni colpiti da queste patologie, è risultato evidenti che esse condividono numerosi aspetti, come ad esempio l'alterata funzionalità dei complessi della catena respiratoria mitocondriale, l'aumento dello stress ossidativo e, in molto casi, la presenza di aggregati proteici nella cellula (Levy et al., 2009). In particolare nel MP, i neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* sono progressivamente persi in maniera selettiva nei pazienti affetti, e nonostante non siano ancora state comprese le ragioni di tale specificità, è ormai assodato che essi presentino difetti nel funzionamento del complesso I della catena respiratoria e che questo porti ad un aumento della produzione di ROS all'interno della cellula (Tretter et al., 2004). Per quanto riguarda invece la presenza di aggregati, il MP è caratterizzato dalla formazione dei cosiddetti corpi di Lewy, che come già menzionato nella Introduzione sono costituiti soprattutto dalla proteina α -sin (Spillantini et al., 1997). Due di queste caratteristiche, cioè l'alterata funzionalità del complesso I e produzione di ROS, hanno un punto in comune: i mitocondri. Questi organelli, infatti, sono la sede del processo di fosforilazione ossidativa, e difetti nel passaggio degli elettroni attraverso i complessi multiproteici della catena respiratoria rappresenta la maggiore fonte di stress ossidativo nelle cellule (Brandon et al., 2006). Fino a pochi anni fa, queste caratteristiche hanno rappresentato l'oggetto di studio della maggior parte delle ricerche volte ad indentificare le cause della morte selettiva dei neuroni dopaminergici, attribuendo la loro particolare vulnerabilità al fatto che, durante il metabolismo del neurotrasmettitore dopamina, ci fosse un'ulteriore produzione di ROS ad opera dell'enzima monoammina ossidasi con il conseguente aggravio del bilancio generale e compromissione della funzionalità cellulare (Levy et al., 2009).

Ultimamente, un nuovo impulso alla ricerca è originato dalla identificazione di numerose famiglie colpite da forme genetiche di MP, causato da mutazioni in alcune proteine come α -sin, parkina, DJ-1 e PINK1 (Cali et al., 2011). Nonostante, apparentemente queste proteine possano sembrare completamente indipendenti nella loro attività e nel loro ruolo cellulare, dopo i primi studi, è apparso evidente che invece esse condividono alcuni aspetti comuni, tra questi la regolazione della morfologia mitocondriale attraverso il processo di fusione e fissione, della funzionalità dei complessi della catena respiratoria e dei processi di autofagia e mitofagia (Cali et al., 2011). Fino a questo momento però, un aspetto importante per la fisiologia mitocondriale, l'omeostasi del calcio cellulare, non era stato approfonditamente studiato. I mitocondri, infatti, sono indispensabili per la mediazione degli effetti di questo importante secondo messaggero cellulare: oltre che fungere da sistema tampone e regolatore dei transienti di Ca^{2+} che s'instaurano a seguito di stimolazione della cellula (Mammucari et al., 2011), i mitocondri, attraverso il segnale Ca^{2+} , controllano sia la

produzione di energia che il processo di morte cellulare dell'apoptosi. Per questi molteplici motivi, il periodo iniziale della mia attività di ricerca durante il dottorato si è incentrato sullo studio degli effetti della sovraespressione e della sottoregolazione di α -sin, parkina, DJ-1 e PINK1 sull'omeostasi del calcio cellulare con particolare riguardo ai mitocondri, allo scopo di individuare possibili aspetti comuni nella attività di queste proteine sia per quanto riguarda il loro contributo ai transienti di Ca^{2+} generati in seguito a stimolazione, sia per quanto riguarda il loro effetto sul controllo della morfologia, mitocondriale e la produzione di ATP. Per quanto riguarda α -sin e DJ-1 l'analisi è stata un poco più approfondita ed in particolare per DJ-1, nella seconda parte del mio progetto gli studi sono stati focalizzati nel chiarire la sua relazione con la proteina p53. Numerose evidenze scientifiche sembrano dimostrare che la morte dei neuroni dopaminergici durante il processo neurodegenerativo sia dovuta a un processo apoptotico, piuttosto che necrotico (Alves da Costa and Checler, 2011). Per questo motivo ci è sembrato interessante analizzare gli effetti di p53, nota proteina proapoptotica, per appurare se alcune delle sue funzioni potessero essere coinvolte nella patogenesi del MP.

3.1 α -sin, parkina e DJ-1: aspetti comuni nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale

La sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1, in cellule epiteliali HeLa, ha sorprendentemente prodotto il medesimo risultato, ha cioè portato ad un aumento significativo dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali. Il dato è stato riprodotto anche in cellule neuronali (SH-SY 5Y) per dare ulteriore conferma dell'effetto delle suddette proteine. Da subito, quindi, siamo riusciti a dimostrare come queste proteine, dalle funzioni completamente diverse tra loro, inducano sui mitocondri un effetto comune sull'omeostasi del Ca^{2+} . L'analisi dei livelli di Ca^{2+} negli altri compartimenti cellulari (citoplasma e RE), ha evidenziato che l'effetto è selettivo per i mitocondri, in quanto sia i transienti di Ca^{2+} citosolico indotti dalla stimolazione cellulare, che i livelli di Ca^{2+} nel RE restano invariati in seguito alla sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1. In seguito al protocollo di sovraespressione, per capire se α -sin, parkina e DJ-1 avessero un ruolo fisiologico nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale, abbiamo utilizzato siRNA specifici per le proteine per ridurre i loro livelli di espressione nelle cellule. I risultati ottenuti hanno sostenuto la nostra ipotesi: i transienti di Ca^{2+} mitocondriali misurati in seguito a stimolo sono risultati significativamente più bassi nelle cellule con una ridotta espressione delle proteine analizzate, confermando che la loro presenza è indispensabile per il corretto funzionamento dell'organello nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} . Tuttavia gli esperimenti di misura del potenziale di membrana mitocondriale (aumentato leggermente solo dalla sovraespressione di parkina) e l'analisi della capacità di accumulare Ca^{2+}

dell'organello in cellule permeabilizzate (invariata rispetto al controllo) hanno dimostrato che pur essendo l'aumento dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali l'effetto finale delle proteine in questione, l'attività dei sistemi di trasporto del Ca^{2+} nei mitocondri di per sé non sembra essere modificata da α -sin, parkina e DJ-1. La spiegazione di questo effetto, infatti, abbiamo dovuto cercarla all'esterno dell'organello. I nostri esperimenti ci hanno portato a scoprire come la sovraespressione di α -sin, parkina e DJ-1 influisca sui siti di contatto tra mitocondri e RE, andando ad aumentare le zone in cui avviene lo scambio dello ione tra i due organelli durante gli stimoli accoppiati alla produzione di InsP3. Questa evidenza è stata ottenuta esprimendo nelle cellule HeLa la sonda mitocondriale mtRFP e quelle reticolare erGFP, e misurando le aree di sovrapposizione dei due segnali nei punti in cui il microscopio confocale non permette di avere una sufficiente risoluzione per distinguere la fluorescenza emessa dai due organelli separatamente. Una ulteriore conferma al presente dato è stata l'analisi dei transienti di Ca^{2+} generati in seguito a stimolo InsP3-mediato, ottenuti misurando separatamente i transienti di Ca^{2+} mitocondriali provocati dal rilascio dello ione dal RE e quelli indotti dall'ingresso dall'ambiente extracellulare. La sovraespressione di parkina e DJ-1, infatti, è stata in grado di aumentare i livelli di Ca^{2+} mitocondriali quando lo stesso proveniva dal RE stimolato, mentre non ha avuto nessun effetto sui transienti di Ca^{2+} mitocondriali quando lo ione proveniva dall'esterno della cellula. Anche sovraesprimendo α -sin abbiamo ottenuto un effetto simile: i mitocondri sono stati in grado di accumulare più Ca^{2+} proveniente dal RE, ma al contrario ne hanno accumulato di meno quando questo proveniva dall'ambiente extracellulare (dato peraltro supportato da altri studi (Hettiarachchi et al., 2009)). I siti di contatto tra mitocondri e RE, rappresentati da una particolare frazione cellulare definita MAMs (mitochondrial-associated ER-membranes), sono un particolare sito della cellula che in questi ultimi anni ha suscitato un notevole interesse sia perché al loro livello sono state identificate numerose proteine che mediano molteplici funzioni cellulari, si pensi per esempio a presenilina, una proteina che fa parte del complesso della γ -secretasi e le cui mutazioni sono coinvolte nella forme genetiche della malattia di Alzheimer (Area-Gomez et al., 2009); sia per la loro importanza nel trasferimento di Ca^{2+} tra i due organelli (Giorgi et al., 2011). Le proteine che regolano questi contatti sono state individuate da diversi articoli e sono VDAC per quanto riguarda il mitocondrio, e il recettore per l'InsP3 per quanto riguarda il RE. Tra i due, a fungere quasi da collegamento, è situata la glicoproteina grp75 (detta anche mortalina o mtHSP70) (Szabadkai et al., 2006). Questa proteina è recentemente risultata correlata al MP in diversi articoli (Burbulla et al., 2010), in quanto è stato dimostrato che essa è in grado di interagire fisicamente con α -sin, con parkina e anche con DJ-1 (Jin et al., 2007; Li et al., 2005a; Yang et al., 2011). Quest'aspetto è particolarmente interessante perché suggerisce un possibile meccanismo molecolare attraverso il quale le tre proteine prese in esame possano agire per

aumentare i siti di contatto tra i due organelli. A ulteriore conferma di questa ipotesi abbiamo anche ottenuto l'evidenza, mediante Western blot, della presenza di DJ-1 nelle MAMs ottenute dal frazionamento di cervelli di topo FWB. L'alterata morfologia mitocondriale, ottenuta trattando le cellule con i siRNA specifici per le nostre proteine potrebbe quindi essere la conseguenza della perdita dei contatti tra RE e mitocondri, e del mancato trasferimento di Ca^{2+} . Per una delle proteine da noi analizzate, cioè α -sin, ci sono alcune evidenze presenti in letteratura che dimostrano come la sua sovraespressione possa indurre frammentazione mitocondriale, e che questo effetto sia annullato dalla co-espressione di parkina e DJ-1 (Kamp et al., 2010). Come già citato nella introduzione, i lavori che hanno riscontrato questo effetto, hanno utilizzato delle tecniche di sovraespressione basate sui lipidi cationici, in grado quindi di ottenere un'efficienza di transfezione estremamente alta, molto diversa quindi da quella da noi ottenuta con la tecnica del calcio-fosfato. La relazione tra tossicità e livello di espressione di α -sin all'interno della cellula è stata analizzata in numerosi lavori (Auluck et al., 2010), e anche nei nostri esperimenti abbiamo voluto approfondire questo aspetto: utilizzando due differenti protocolli sperimentali, cioè il trattamento con acidi valproico e quello con la proteina di fusione TAT- α -sin. Utilizzando questi trattamenti siamo riusciti a modulare finemente la concentrazione intracellulare di α -sin, in modo da riprodurre sia gli stessi effetti ottenuti con sovraespressione con il metodo di transfezione che prevedeva l'uso di calcio-fosfato, sia di indurre una elevata espressione della proteina. E' stato interessante notare come l'elevata espressione della proteina non solo portava ad un fenotipo opposto, cioè ad una riduzione significativa dei transienti di Ca^{2+} mitocondriale, ma anche ad una redistribuzione di α -sin all'interno della cellula in "foci citoplasmatici" localizzati piuttosto che diffusa in tutto il citoplasma. La teoria che abbiamo elaborato è basata sull'idea che α -sin sia indispensabile per la corretta funzionalità della cellula, e che un modesto aumento della sua espressione possa essere positivo per la stessa. Al contrario invece una sua espressione massiva porta all'aggregazione della proteina in foci citoplasmatici, che rappresentano così un meccanismo di perdita di funzione. La cellula, infatti, non può più utilizzare la proteina che risulta "sequestrata" in questi aggregati. Per questo motivo quindi la comparsa dei foci citoplasmatici è correlata con un abbassamento dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali, simulando così l'effetto ottenuto coi siRNA contro di essa. A differenza del trattamento con i siRNA però, in queste condizioni, non abbiamo osservato alcuna alterazione della morfologia mitocondriale. Una prima spiegazione a questo fenomeno potrebbe essere che il sequestro della proteina nei foci citoplasmatici non sia totale, ma che una ridotta quantità di α -sin sia mantenuta nella forma "solubile" e sia quindi sufficiente a svolgere parzialmente le sue funzioni e a mantenere la morfologia mitocondriale. I dati ottenuti con le due forme mutanti di α -sin, A53T e A30P, concordano perfettamente con questa ipotesi: la loro capacità

di influire sui transienti di Ca^{2+} mitocondriale è pari a quella della forma nativa, tuttavia le mutazioni predispongono una più rapida redistribuzione delle forme mutate di α -sin nei foci citoplasmatici, come suggerito dai dati delle cellule trattate con TAT-A53T e TAT-A30P.

Per quanto riguarda α -sin inoltre, siamo andati ad analizzare un altro dei suoi effetti sulla cellula, cioè la sua relazione con il processo di autofagia. Recentemente è stato dimostrato che il trasferimento costitutivo di Ca^{2+} dal RE ai mitocondri sia indispensabile per la corretta produzione di energia da parte dei mitocondri stessi, e se questo trasferimento viene a mancare, si ha un'attivazione della via autofagica, come risposta allo stress da mancanza di nutrienti (Cardenas et al., 2010). L'analisi dell'attivazione dell'autofagia (mediante analisi dei livelli di espressione di LC3I/LC3II e p62) ci ha permesso di notare come, nelle situazioni in cui il segnale Ca^{2+} nei mitocondri risulta alterato di conseguenza alla perdita di funzione di α -sin (alte dosi di VPA, TAT- α -sin o siRNA contro α -sin), si assiste ad un'attivazione della via autofagica. L'autofagia quindi sembra essere un sistema compensativo per contrastare l'alterata omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale indotta dalla perdita di funzione di α -sin. Come dimostrato da diversi articoli presenti in letteratura, di cui abbiamo discusso nell'introduzione, una delle dirette conseguenze dell'entrata di Ca^{2+} nei mitocondri, è un aumento della produzione di ATP, mediata dall'attivazione di tre enzimi del ciclo di Krebs. Per questo motivo abbiamo ipotizzato che l'aumento dei transienti di Ca^{2+} mitocondriali ottenuti in seguito alla sovraespressione delle nostre proteine potesse potenziare la produzione di ATP in seguito a stimolo. Sorprendentemente tuttavia non abbiamo trovato questa correlazione: la sovraespressione di α -sin e DJ-1, infatti, provoca una riduzione della produzione di ATP mitocondriale in seguito alla stimolazione InsP3-mediato, mentre quella di parkina non ha mostrato alcun effetto rispetto alle cellule di controllo. Al momento purtroppo non abbiamo nessuna spiegazione convincente per questi effetti. È noto dalla letteratura che tutte e tre le proteine prese in esame sono in grado di interagire con l'attività dei complessi della catena respiratoria, anche se per quanto riguarda DJ-1 e parkina, è stato proposto che possano avere un ruolo di attivazione della catena respiratoria (Hayashi et al., 2009; Kuroda et al., 2006a; Muftuoglu et al., 2004; Mullett and Hinkle, 2011; Palacino et al., 2004). Per α -sin, invece, in letteratura esistono dati discordanti: è stato riportato che la sua assenza in topi knockout altera l'attività dei complessi I e III (dando supporto alla tesi di un suo ruolo fisiologico nella cellula) (Ellis et al., 2005), mentre in altri articoli si afferma che sia in grado di inibire il complesso I e IV della catena respiratoria una volta sovraespressa (supportando il dato osservato nei nostri esperimenti) (Devi et al., 2008; Martin et al., 2006). Appare evidente che questi aspetti richiedono un ulteriore approfondimento.

3.2 DJ-1 e p53: la loro relazione nel controllo della morte cellulare per apoptosi attraverso la modulazione dell'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale

Una volta analizzati gli effetti della sovraespressione di DJ-1 sull'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale e sulla morfologia degli organelli ci siamo chiesti se la sua azione anti-apoptotica potesse essere legata al suo ruolo nella modulazione del segnale Ca²⁺ mitocondriale. Come descritto in precedenza DJ-1, oltre ad essere coinvolta in alcune forme genetiche di MP, è molto importante per quanto riguarda la trasformazione neoplastica delle cellule (Kim et al., 2010; Kim et al., 2009; Nagakubo et al., 1997). La proteina, infatti, nota per la sua attività antiapoptotica, è stata riscontrata sovraregolata in molte forme di tumori e per questo motivo diversi ricercatori hanno ipotizzato che potesse avere degli effetti opposti rispetto a p53, nota proteina proapoptotica. È noto che la funzione proapoptotica di p53 segue principalmente due vie: una via “trascrizionale”, che prevede l'attivazione o l'inibizione della trascrizione di specifici geni coinvolti nell'attivazione del processo apoptotico, ed una “non trascrizionale”, definita anche “mitocondriale” che prevede la modulazione della attività delle proteine della famiglia di Bcl-2 sulla membrana mitocondriale, promuovendo la permeabilizzazione degli organelli e rendendoli così più suscettibili a scatenare il processo apoptotico (Brady and Attardi, 2010). Nonostante DJ-1 presenti anche effetti trascrizionali, e sia stato dimostrato che quindi possa interferire con l'attività di p53 regolandone i livelli di espressione, nel nostro lavoro abbiamo preferito concentrarci solo sugli effetti “mitocondriali” delle due proteine prese in esame. Per questo motivo abbiamo utilizzato nei nostri esperimenti come controllo anche una forma mutata di p53, cioè p53ΔNLS, che non è in grado di traslocare al nucleo e mediare quindi i suoi effetti trascrizionali (Tasdemir et al., 2008). I dati che abbiamo ottenuto sovraesprimendo p53 in cellule HeLa hanno evidenziato come essa sia in grado di avere un effetto sia sulla morfologia mitocondriale, alterandola in maniera profonda, sia sui transienti di Ca²⁺ generati in seguito alla stimolazione cellulare, abbassandoli significativamente rispetto a quelli misurati nelle cellule di controllo. La sovraespressione della forma mutata p53ΔNLS produce lo stesso fenotipo della sovraespressione della proteina nativa, confermando così che gli effetti osservati sono indipendenti dall'attività trascrizionale di p53. Abbiamo anche osservato che la co-espressione di DJ-1 insieme a p53 è in grado di revertire completamente gli effetti deleteri di quest'ultima, ristabilendo la corretta morfologia del network mitocondriale, e annullando completamente gli effetti sul Ca²⁺ mitocondriale. Per quanto riguarda quest'aspetto sembra che DJ-1 sia in grado di dominare p53, infatti, i transienti di Ca²⁺ mitocondriali in seguito a stimolo nelle cellule sovraesprimenti DJ-1 e in quelle sovraesprimenti p53 e DJ-1 sono entrambi significativamente più alti rispetto a quelli misurati nelle cellule di controllo. Anche in questo caso, tutti i dati sono stati

confermati utilizzando p53 Δ NLS. Abbiamo infine iniziato a indagare come DJ-1 potesse essere in grado di annullare gli effetti proapoptotici di p53, analizzando i livelli di espressione di PARP processata in seguito a stimolo apoptotico rappresentato da staurosporina. Anche se altri esperimenti devono essere ripetuti, i primi esperimenti ottenuti mostrano come la coespressione di DJ-1 insieme a p53, riduca notevolmente la quantità della proteina PARP processata (indice dell'attivazione dell'apoptosi) rispetto alle cellule in cui è sovraespressa solo p53. Una volta appurato come DJ-1 sia in grado di annullare gli effetti di p53 su molteplici aspetti della cellula, abbiamo anche provato a indagare come questa sua attività possa essere mediata. Nonostante moltissimi articoli citino come DJ-1 sia in grado di bloccare la trascrizione di p53, abbassandone quindi i suoi livelli, noi abbiamo anche provato a controllare un altro aspetto, cioè la possibilità che DJ-1 ne aumentasse la velocità di degradazione. L'esperimento di cicloesimide-chase ci ha fornito una dimostrazione del fatto che DJ-1 sia in grado di indurre una più veloce degradazione di p53, contribuendo così ad annullarne gli effetti. E' curioso notare come in letteratura si è descritto che anche p53 è in grado di aumentare la degradazione di DJ-1 (Vasseur et al., 2011), tuttavia nei nostri esperimenti non abbiamo notato questo effetto. Tuttavia le condizioni sperimentali utilizzate in questo articolo sono decisamente differenti dalle nostre, e la degradazione di DJ-1 è visualizzata solo dopo 5 ore di trattamento con cicloesimide, condizione che nei nostri esperimenti non è mai stata raggiunta. L'effetto su p53 da noi riscontrato, infatti, è visualizzabile in brevissimo tempo, ed è significativo già dopo 15 minuti dal trattamento.

3.3 La proteina chinasi PINK1 e il controllo dell'omeostasi del Ca²⁺ mitocondriale

L'altra proteina coinvolta nelle forme genetiche di MP che abbiamo studiato è stata PINK1. Per essa abbiamo preferito presentare a parte i dati ottenuti, poiché si scostavano da quelli visti con le altre proteine (α -sin, parkina e DJ-1). Oltretutto, al momento, non abbiamo ancora ben chiaro il meccanismo d'azione di PINK1, e saranno necessari ulteriori esperimenti per delucidare completamente la situazione. Con i dati in nostro possesso possiamo affermare che la sovraespressione di PINK1 è in grado di modulare sia la morfologia mitocondriale che la capacità di accumulare Ca²⁺ in relazione al suo livello di espressione e probabilmente alla sua distribuzione a livello delle membrane mitocondriali. I dati ottenuti dall'esperimento di time-course, in cui abbiamo osservato che la progressiva espressione della proteina nell'organello altera in maniera tempo dipendente i transienti di Ca²⁺ ottenuti in seguito alla stimolazione InsP3-dipendente, hanno evidenziato che un basso livello di espressione sembra mediare un aumento dei transienti, mentre a mano a mano che la proteina si accumula, i livelli di Ca²⁺ mitocondriali si riducono, fino a diventare

significativamente più bassi rispetto al controllo. In accordo con questo processo, anche la morfologia mitocondriale cambia, passando da normale a frammentata, a mano a mano che PINK1 si accumula nell'organello. Quest'osservazione correla con i dati presenti in letteratura in quanto è stato dimostrato che, in seguito alla depolarizzazione mitocondriale indotta dal trattamento con disaccoppianti, si verifica un accumulo della proteina a livello della membrana mitocondriale esterna e che tale accumulo rappresenta un segnale per innescare il processo di mitofagia, cioè quel processo che porta alla eliminazione selettiva dei mitocondri danneggiati.

Questo meccanismo “bifasico” nella regolazione del segnale Ca^{2+} è particolarmente interessante e necessita di ulteriori approfondimenti. Una possibilità è che esso possa essere legato non solo alla quantità di PINK1, ma piuttosto ad un suo diverso processamento. PINK1, infatti, com'è già stato descritto è una proteina chinasi mitocondriale che viene importata e si localizza a livello della membrana mitocondriale interna sotto forma di proteina full-length solo in piccolissima quantità. La maggior parte di proteina PINK1 viene processata e rilasciata sotto forma di proteina solubile che è poi rapidamente degradata, garantendo così un rapido turnover della proteina. Un altro aspetto interessante che è emerso dai nostri esperimenti è rappresentato dal fatto che le misure condotte in cellule permeabilizzate hanno evidenziato, a 16 ore dalla transfezione, una ridotta capacità dei mitocondri di accumulare Ca^{2+} indipendentemente dalla concentrazione di Ca^{2+} imposta, come se fosse compromessa la loro via di ingresso. Nonostante in letteratura si è proposto che la perdita di funzione di PINK1 fosse responsabile del sovraccumulo di Ca^{2+} nei mitocondri, autori diversi hanno proposto che ciò dipendesse da un eccessivo ingresso di Ca^{2+} attraverso l'uniporto (Marongiu et al., 2009) così come da un difetto dell'efflusso attraverso lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Gandhi et al., 2009). La recente identificazione molecolare sia dell'uniporto (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011) che dello scambiatore (Palty et al., 2010) apre nuove possibilità di indagine nella identificazione dei possibili bersagli molecolari della azione di PINK1. Anche se i dati da noi ottenuti in seguito al silenziamento di PINK1 non hanno evidenziato differenze nella modulazione del segnale Ca^{2+} pensiamo che PINK1 possa avere un ruolo nel controllo della attività delle proteine che trasportano Ca^{2+} nei mitocondri. L'analisi della produzione di ATP citosolica e mitocondriale in seguito a stimolo indica che la proteina possiede la capacità di influire su quest'aspetto della cellula, soprattutto considerando i diversi articoli che citano come necessaria la presenza di PINK1 per la funzionalità del complesso I della catena respiratoria (Morais et al., 2009; Papa et al., 2009). Per il momento però non abbiamo una possibile spiegazione sui suoi effetti. Possiamo concludere dicendo che ulteriori esperimenti sono sicuramente necessari per valutare al meglio l'attività di questa proteina sulla fisiologia mitocondriale, e soprattutto sulla sua funzione nell'omeostasi del Ca^{2+} , visti

anche i numerosi dati discordanti presenti in letteratura (Akundi et al., 2011; Gandhi et al., 2009; Heeman et al., 2011; Marongiu et al., 2009).

In conclusione possiamo affermare che il lavoro svolto in questa tesi ha contribuito a dimostrare come quattro proteine coinvolte in forme di MP genetico, cioè α -sin, parkina, DJ-1 e PINK1 siano in grado, una volta sovraesprese, di modificare i transienti di Ca^{2+} mitocondriali in seguito a stimolazione InsP3-mediata. Sorprendentemente, per tre di loro (α -sin, parkina e DJ-1), la modalità con cui mediano questo fenotipo è condivisa: infatti, sono in grado di aumentare i siti di contatto tra mitocondri e RE, promuovendo così il trasferimento di Ca^{2+} tra i due organelli in seguito a stimolo. Inoltre, la loro assenza risulta essere deleteria per la funzionalità mitocondriale, dando così un ulteriore ruolo fisiologico a parkina e DJ-1, ma soprattutto ad α -sin. Questa scoperta avvalorava sempre di più l'idea che sta emergendo nell'attuale ricerca scientifica sul MP, cioè che le proteine coinvolte nella patogenesi di questa malattia, anche se possiedono una funzione e una localizzazione cellulare molto diversa tra loro, risultino avere nei mitocondri il denominatore comune. Nel nostro caso il loro effetto è accomunato sia dal bersaglio, rappresentato dagli effetti sui transienti di Ca^{2+} sull'organello, sia dal meccanismo con cui è mediato, cioè l'aumento delle interazioni tra mitocondri e RE. Negli esperimenti successivi abbiamo cercato di correlare l'effetto osservato sui transienti di Ca^{2+} con la produzione di ATP da parte dell'organello, tuttavia i risultati ottenuti sono stati variabili e non sempre di facile interpretazione, a suggerire probabilmente un ruolo di queste proteine direttamente sull'attività dei complessi respiratori e non solamente nella modulazione del segnale Ca^{2+} mitocondriale.

Lo scopo finale della nostra attività di ricerca è identificare eventuali caratteristiche o meccanismi molecolari comuni che portano allo sviluppo di malattie degenerative apparentemente simili dal punto di vista del fenotipo clinico ma diverse per la specificità della popolazione neuronale colpita dalla degenerazione.

Implicazioni importanti per lo sviluppo di approcci terapeutici, quanto meno mirati alla riduzione dei sintomi, potrebbero derivare dal chiarimento dei meccanismi molecolari alla base di queste malattie, in particolare dallo sviluppo di modelli neuronali appropriati. Le disfunzioni dell'omeostasi del Ca^{2+} e del metabolismo mitocondriale appaiono un bersaglio promettente per una possibile terapia. In particolare, l'approccio terapeutico potrebbe essere focalizzato a: i) modulare farmacologicamente l'omeostasi del Ca^{2+} ; ii) modulare l'attività della catena respiratoria; iii) ridurre lo stress ossidativo; iv) inibire la morte cellulare per apoptosi indotta dal danno mitocondriale.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Colture cellulari

Tutte le operazioni con le cellule sono state effettuate in sterilità sotto la cappa a flusso laminare verticale. Sono state utilizzate cellule HeLa e SH-SY5Y. Le cellule sono state mantenute in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) addizionato del 10% FBS, 2mM L-glutamina e 75U/ml penicillina, 50µg/ml streptomicina. Le cellule sono state mantenute in incubatore Haereus a 37°C, in un'atmosfera umida contenente 5% CO₂. Quando le cellule raggiungevano 70-80% della confluenza cellulare, sono state lavate con PBS e successivamente staccate dalle fiasche usando una soluzione con 0.05% di tripsina e 0.2% EDTA in PBS (140mM NaCl, 2mM KCl, 1.5mM KHPO₄, 8mM Na₂HPO₄, pH=7.4) per 4' a 37°C nell'incubatore. La tripsinizzazione è stata inibita aggiungendo nelle fiasche una soluzione fresca del medium in cui le cellule venivano mantenute in coltura. In seguito le cellule sono state centrifugate a 1000rpm per 4' a RT in una centrifuga Beckman GS-15R (rotore S4180). Il pellet è stato risospeso nel medium di coltura per gli ulteriori esperimenti.

4.2 Transfezione

Le cellule HeLa sono state transfettate con il metodo del calcio fosfato. Un giorno prima della transfezione, in condizioni di crescita logaritmica (50-60%), le cellule sono state seminate su vetrini da 13mm (24mm nel caso degli esperimenti con TMRM o per l'analisi dei contatti mitocondri-reticolo) di diametro che erano già stati posizionati in piastre da 24 pozzetti (6 pozzetti nel caso degli esperimenti con TMRM o per l'analisi dei contatti mitocondri-reticolo). Le cellule HeLa sono state transfettate con la tecnica del calcio-fosfato descritta in precedenza (Rizzuto et al., 1995). I volumi e le quantità per i vetrini da 13mm sono state moltiplicate per 4 volte nel caso degli esperimenti con TMRM o per l'analisi dei contatti mitocondri-reticolo (vetrini da 24mm). Dopo 12 ore le cellule sono state lavate 2 volte con PBS per eliminare i precipitati di calcio fosfato rimasti. Le cellule SH-SY5Y sono transfettate con il metodo dei lipidi cationici utilizzando TransFectin Lipid Regent (BioRad) in rapporto 3:1 rispetto al DNA plasmidico, in accordo con i protocolli forniti dalla ditta. Il terreno contenente la soluzione di transfezione è sostituito dopo 4 ore con terreno fresco. Dal momento della transfezione all'esperimento in media trascorrono 36 ore. Per gli esperimenti TAT, le proteine fuse con TAT sono state aggiunte direttamente sulle cellule transfettate con l'equorina e incubate per 2,5 ore. Per il VPA (Sigma) invece, le cellule sono state trattate per 6 giorni e transfettate il giorno prima della lettura al luminometro con i costrutti indicati. Dove è indicato, le cellule sono state trattate per 16 ore con bafilomicina A1 (Sigma), con staurosporina 1µM per 4 ore (Sigma) o con cicloesimide 100µg/ml (Sigma) per il tempo indicato.

4.3 Anticorpi

Gli anticorpi primari utilizzati sono:

- anticorpo monoclonale di topo anti α -sin, Santa Cruz, sc-12767, 1:20 per IF, 1:200 per WB

- anticorpo policlonale di coniglio anti α -sin, gentilmente fornitoci dalla Dr.ssa E. Greggio (Università di Padova), 1:50 per IF
- anticorpo monoclonale di topo anti-DJ-1, Stressgen, KAM-SA100, 1:50 per IF, 1:2000 in latte 5% in TBST per WB
- anticorpo monoclonale di topo anti-parkina, Santa Cruz, sc-32282, 1:50 per IF, 1:1000 per WB
- anticorpo policlonale di coniglio anti-PINK1, Novus Biologicals, BC100-494, 1:50 per IF, 1:1000 per WB
- anticorpo policlonale di coniglio anti-p53, Santa Cruz, sc-6243, 1:50 per IF, 1:2000 per WB
- anticorpo policlonale di coniglio anti-LC3B, Cell Signalling, 2775, 1:750 per WB
- anticorpo policlonale di coniglio anti-p62, Sigma, P0067, 1:1000 per WB in latte 5% in TBST
- anticorpo policlonale di coniglio anti-PARP, frammento di 85kDa, Promega, G7341, 1:1000 per WB
- anticorpo policlonale di coniglio anti-c-MYC, Sigma, C3956, 1:50 per IF, 1:2000 per WB
- anticorpo monoclonale di topo β -actina, Sigma, 1:30000 per WB
- anticorpo monoclonale di topo β -tubulina, Santa Cruz, 1:2000 per WB

Dove non specificato, per il WB, gli anticorpi sono stati diluiti in TBST.

4.4 Western blot

36 ore dopo la transfezione, le cellule sono state lavate 2 volte con PBS freddo e raccolte nel tampone di estrazione contenente 2% CHAPS in Hepes-buffered saline (HBS, 50 mM HEPES, 0.2M NaCl, pH 6.8), N-ethylmaleimide, 1mM PMSF and inibitori delle proteasi (Sigma). Dopo 20min a 4°C e 10min a 10000rpm a 4°C, il surnatante è stato raccolto e congelato a -80°C. La determinazione della concentrazione delle proteine totali è stata eseguita mediante il metodo di Bradford (Sigma). Nel momento dell'uso, le proteine di membrana sono state solubilizzate nel tampone di corsa Laemmli (62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 0.2% SDS, 10% glicerolo, 0.001% Blu di Bromofenolo, 10% DTT) e incubate a 95°C per 5min prima di essere caricate su gel di poliacrilamide. Le proteine solubilizzate nel tampone di caricamento Laemmli sono state separate tramite SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis) secondo il metodo convenzionale Laemmli (Laemmli, 1970). Per la separazione delle proteine sono stati usati diversi gel di separazione da 10, 12, 15, 18% a seconda della misura delle proteine. Il tampone della corsa elettroforetica conteneva 25mM Tris-HCl pH 8.3, 192mM glicina e 0.1% SDS e l'apparecchio di elettroforesi è stato fornito da *BIO-RAD* (Criterion Precast Gel System). I gel sono stati lasciati a correre approssimativamente a 150V per 2 ore. Per ogni singolo pozzetto sono stati caricati dai 20 μ g ai 40 μ g di proteine totali. Gli standard di pesi molecolari utilizzati sono della ditta *BIO-RAD* (Precision Plus Protein Standard) e contengono una miscela di proteine il cui il peso molecolare è compreso da 10KDa fino a 250KDa. Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato sottoposto a un'analisi di Western Blot. In seguito all'elettroforesi, le proteine separate sono state trasferite su membrane di PVDF (BioRad) mediante elettrotrasferimento per 1.5h a 300mA nel tampone di trasferimento contenente 25mM Tris-HCl pH 8.4, 192 mM glicina, 0.03% SDS e 20% metanolo. Il trasferimento delle proteine è avvenuto nell'apparecchiatura "Criterion Plate Blotter" (*BIO-RAD*). Per controllare l'avvenuto trasferimento delle proteine, le membrane di PVDF sono state incubate con colorante Coomassie e successivamente decolorate con metanolo. In seguito è stata effettuata l'incubazione per 1ora a RT

(Room Temperature) o ON (Over/night) a 4°C in una soluzione saturante al 5% di latte in polvere scremato contenente 0,1% di Tween20 (SIGMA) in TBS per saturare i siti di legame idrofobici aspecifici. In seguito è stato aggiunto l'anticorpo primario opportunamente diluito e lasciato ad incubare per ON a 4°C.

Dopo 3 lavaggi da 10min con PBS con l'aggiunta di Tween20 0,1% (TBST), i filtri sono stati successivamente incubati per 2 ore a RT con l'anticorpo secondario coniugato al gruppo enzimatico HRP (HorseRadish-Peroxidase). Gli anticorpi secondari usati, diluiti in TBST, sono:

- anti-mouse HRP, Santa Cruz, 1:2000
- anti-rabbit HRP, Santa Cruz, 1:2000

Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario opportuno sono stati effettuati 3 lavaggi da 10 min con TBST. La rivelazione delle bande proteiche è stata resa possibile tramite la chemiluminescenza che si ottiene incubando le membrane con il reagente "Luminata Forte" (Millipore) per 30 sec. Le foto sono state eseguite utilizzando lo strumento KODAK Pro mediante l'apposito software in dotazione. L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata mediante il programma ImageJ.

4.5 Immunocitochimica

Le cellule transfettate con i plasmidi d'interesse cresciute su vetrini da 13mm di diametro sono state lavate 2 volte con PBS e fissate con formaldeide 3.7% in PBS per 20'. Dopo 3 lavaggi in PBS le cellule sono state incubate in Triton X-100 0.1% in PBS (20min per cellule HeLa, 10min per cellula SH-SY 5Y) e poi lavate 3 volte per 10min con 1% gelatina in PBS (Tipo B estratta da pelle di vitello, SIGMA). Dopo 3 lavaggi da 10' in PBS, le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario opportuno nella diluizione indicata in precedenza per 1,5 ore a 37°C. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario sono stati effettuati 3 lavaggi da 10' e successivamente le cellule sono state incubate a RT per 30 min con gli anticorpi secondari coniugati con i cromofori AlexaFluor594, AlexaFluor488 e AlexaFluor405 (Molecular Probes, Invitrogen) ad una diluizione 1:100. Dopo 3 lavaggi in PBS, i vetrini sono stati montati su vetrini portaoggetti mediante una soluzione Mowiol (81386, Sigma) e sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza ZEISS Axiovert S100TV (Carl Zeiss Vision), equipaggiata con una fotocamera digitale CCD 16-bit (Micromax, Princeton Instruments). Le immagini sono state acquisite mediante il software Axiovision (Carl Zeiss Vision), o con un microscopio confocale Leica SP5 all'ingrandimento 63X, mediante il software in dotazione.

4.6 Isolamento DNA da batteri

Le cellule *E.coli* che contengono il plasmide d'interesse sono state incubati a 37°C O/N in 500ml di LB con l'antibiotico opportuno. L'estrazione del DNA plasmidico da batteri è stata effettuata tramite il kit commerciale "Pure Link" (Invitrogen). L'eluizione finale del DNA è stata eseguita in circa 300µl di TE. La quantificazione è stata effettuata mediante lettura spettrofotometrica dell'assorbanza dei campioni a 260nm, considerando che $1OD_{260} = 50mg/ml$. Per controllare il livello di contaminazione del campione di DNA da parte delle proteine è stata effettuata una lettura dell'assorbanza del campione a valori di lunghezza d'onda di 280nm.

4.7 Misura della concentrazione di ione Calcio in cellule vive

Nei nostri esperimenti abbiamo usato come metodo per misurare la $[Ca^{2+}]$ in cellule vive la fotoproteina Ca^{2+} sensibile equorina (AEQ). AEQ è una proteina naturalmente prodotta dalla medusa luminescente *Aequorea victoria* (Shimomura and Johnson, 1972; Shimomura et al., 1962). La sua forma completa è costituita da un'apoproteina di 21kDa e da un gruppo prostetico idrofobico di 400Da chiamato celenterazina, che lega la fotoproteina attraverso un legame perossidico. In seguito al legame dell'equorina con 3 ioni Ca^{2+} , mediante domini ad alta affinità di tipo "EF-hand", si ottiene la rottura del legame covalente e conseguente emissione di fotoni (Blinks, 1972). Il gruppo prostetico si stacca sotto forma di celenterammide e questa reazione è di natura irreversibile (Blinks, 1972) (Figura 5.1). Tuttavia, nonostante la reazione luminosa Ca^{2+} sensibile sia una reazione irreversibile, è possibile misurare un parametro dinamico come la variazione della $[Ca^{2+}]$ grazie all'esistenza di una relazione tra il logaritmo della velocità di emissione di fotoni (L), (espressa come frazione rispetto alla velocità massima di luminescenza L_{max}), e il logaritmo della $[Ca^{2+}]$. Valori ottenuti attraverso misurazioni in vitro, in condizioni note di pH, forza ionica, $[Mg^{2+}]$ e temperatura consentono di costruire una curva di calibrazione di forma sigmoide sulla base della quale, nell'ambito fisiologico di concentrazioni di Ca^{2+} (0.1-10 μ M), è possibile correlare in ogni istante la frazione di equorina consumata con il valore di Ca^{2+} a cui la fotoproteina è esposta (Allen and Blinks, 1978). Rispetto agli indicatori fluorescenti sintetici, la natura proteica di AEQ offre diversi vantaggi, tra i quali la localizzazione esclusivamente citoplasmatica nella sua forma nativa, che evita l'inconveniente di segnali spuri provenienti dagli organelli subcellulari. Inoltre la sua sequenza amminoacidica può essere modificata in modo da includere una sequenza di localizzazione subcellulare o essere fusa ad una proteina che contiene già tutte le informazioni necessarie per il suo specifico direzionamento (Brini et al., 1994). L'utilizzo delle chimere AEQ ha permesso di compiere notevoli passi avanti nella comprensione del ruolo del $[Ca^{2+}]$ nella cellula. Alcuni articoli hanno rivelato che i mitocondri sono in grado di accumulare Ca^{2+} a concentrazioni dell'ordine del μ M, grazie alla presenza di microdominii ad elevata Ca^{2+} che si generano sia vicinissimo ai canali di rilascio del ER (Rizzuto et al., 1993), che nella regione a ridosso della membrana plasmatica la $[Ca^{2+}]$ è un ordine di grandezza più elevata che nel resto del citoplasma (Marsault et al., 1997) o che anche l'apparato di Golgi svolge il ruolo di deposito intracellulare di Ca^{2+} (Pinton et al., 1998).

4.8 Ricostituzione e misura dell'equorina in cellule vive

Le cellule per essere usate con il saggio di equorina sono state seminate su vetrini 13mm di diametro. Il giorno dopo sono state transfettate (o cotransfettate con le proteine di nostro interesse) con il plasmide che esprime l'equorina indirizzato al citoplasma (cytAEQ), al mitocondrio (mtAEQ) o al RE (erAEQ) con il metodo di calcio fosfato. L'equorina utilizzata per la sonda citosolica è nativa, mentre l'equorina utilizzata per la sonda mitocondriale o reticolare è la forma mutata a bassa affinità per il Ca^{2+} (Chiesa et al., 2001). Dopo 36-48 ore dalla transfezione è stato possibile misurare la concentrazione del Ca^{2+} . Per quanto riguarda la sonda nativa cytAEQ e la sonda a bassa affinità mtAEQ, le cellule transfettate sono state immerse in 300 μ l di DMEM

addizionato con FBS 1% e celenterazina 5 μ M (Molecular Probes, Invitrogen). Le cellule sono state incubate per 3 ore (cytAEQ) o 1,5 ore (per mtAEQ) in incubatore 37°C con 5% CO₂ per poi essere lette all'equorinometro. Per quanto riguarda la sonda a bassa affinità erAEQ, il RE deve essere svuotato del calcio in esso contenuto durante la ricostituzione, in modo da non consumare l'equorina prima della misurazione. Le cellule, quindi, sono state immerse per 1,5 ore a 4°C in 200 μ l di salina KRB-glucosio (Krebs Ringer Buffer: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₃PO₄, 1 mM MgSO₄, 20 mM HEPES, pH 7.4, 37°C + 5.5 mM glucosio) con l'aggiunta del calcio ionoforo ionomicina 5 μ M, EGTA 600 μ M e celenterazina n 5 μ M (Tebu Bio). In seguito per procedere alle letture le cellule sono state lavate per 3 volte con KRB-glucosio 1mM EGTA 2% BSA (Sigma) (Brini, 2008). Una volta che le cellule sono state trasferite al luminometro, sono state perfuse con una soluzione di KRB-glucosio 1mM CaCl₂ o KRB-glucosio 100 μ M EGTA o KRB-glucosio 1mM EGTA in base al protocollo specifico per la misurazione. Dove indicato, alla soluzione di perfusione è stata aggiunta istamina 100 μ M o bradikina 100nM. Per le misure della concentrazione di Ca²⁺ in cellule permeabilizzate, dopo la ricostituzione, le cellule sono state perfuse con i seguenti buffer: buffer intracellulare modificato (IBM: 130 mM KCl, 10mM NaCl, 0.5 mM KH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 5 mM succinato di sodio, 3 mM MgCl₂, 20mM HEPES, 5.5 mM glucosio, 1mM acido piruvico, 2 mM EGTA, 2 mM HEDTA, pH 7.0) per 20sec, IBM con digitonina 25 μ M per 1min per permeabilizzare le cellule, IBM contenente 1mM ATP (IBM -ATP) e poi è stato aggiunto il calcio al medesimo buffer dove indicato (Rapizzi et al., 2002; Rizzuto et al., 1993). Alla fine dei singoli esperimenti, le cellule sono state trattate con una soluzione ipo-osmotica 10mM Ca²⁺ e 100 μ M digitonina in modo da provocare la rottura cellulare e consumare così l'equorina residua. Infatti, per convertire i dati di luminescenza in valori di Ca²⁺ assoluto, è necessario conoscere la quantità totale dell'equorina funzionale. La misura della luminescenza dell'AEQ si basa su un sistema di rivelazione descritto precedentemente (Cobbold, 1991). Le cellule piastrate su vetrini sono state posizionate all'interno di una camera di perfusione posta a stretto contatto con un fotomoltiplicatore con amplificatore- discriminatore incorporato. Il segnale di uscita dall'amplificatore-discriminatore viene raccolto da un contatore di fotoni EMI C660, inviato ad un computer e registrato per una successiva analisi. La camera di perfusione è termostata a 37°C e perfusa tramite una pompa peristaltica con le soluzioni fisiologiche a base di KRB. La conversione del segnale di fluorescenza in valori di concentrazione di Ca²⁺ è stato calibrato tramite un programma costruito su un modello matematico (Barrero et al., 1997; Brini et al., 1995).

4.9 Trattamento con siRNA

Le cellule HeLa sono state transfettate con oligonucleotidi siRNA validati (Quiagen) diretti contro α -sin (Hs_SNCA_5 siRNA, SI03026478), DJ-1, e parkina (Hs_PARK2_9 siRNA, SI0424039) usando il reagente Attractene (Quiagen) in accordo con le indicazioni della ditta. Gli oligonucleotidi siRNA di controllo sono stati acquistati sempre dalla Quiagen (AllStars Neg. siRNA AF 488 1027284). Gli esperimenti sono stati eseguiti 48 ore dopo la transfezione dei siRNA.

4.10 Analisi TMRM

Per questi esperimenti è stato utilizzato il metodo "non-quenching", che risulta adeguato per la comparazione di due popolazioni di cellule (Duchen et al., 2003), e quindi una diminuzione del segnale TMRM riflette una depolarizzazione mitocondriale. Insieme alla proteina d'interesse è stata transfettata anche una GFP, in modo da poter individuare al microscopio le cellule transfettate. Le

cellule sono state caricate con TMRM 20nM in KRB-glucosio CaCl₂ 1mM per 30 min a 37°C. la fluorescenza del TMRM è stata registrata alla lunghezza d'onda di 510 nm con un microscopio confocale Leica SP2 con ingrandimento 40X. La fluorescenza basale è stata registrata dopo il trattamento con il disaccoppiante FCCP 10µM per redistribuire il TMRM all'esterno dei mitocondri. La misura è stata effettuata su ROI posizionate off-line nelle zone periferiche della cellula, mediante il software ImageJ.

4.11 Analisi della morfologia mitocondriale

La sonda mtRFP è stata utilizzata per individuare la morfologia mitocondriale in cellule cotransfettate con le proteine di nostro interesse. Le cellule che mostrano un network di mitocondri filamentosi sono state classificate come normali (non frammentate), le cellule con mitocondri frammentati o parzialmente troncati sono state classificate con frammentate (vedere le immagini rappresentative). Per valutare la forma dei mitocondri, le immagini che sono state acquisite, sono state analizzate mediante ImageJ per misurarne le caratteristiche. Il valore di circolarità mitocondriale è stato ottenuto dal software mediante l'utilizzo di un'apposita macro come descritto in precedenza (Dagda et al., 2009).

4.12 Analisi dei siti di contatto tra mitocondri e RE

Le cellule seminate su vetrini da 24mm sono state cotransfettate con le proteine di interesse e le sonde mtRFP e erGFP. La fluorescenza è stata analizzata in cellule vive utilizzando un microscopio Leica SP2 o SP5. Le stack sono state acquisite ogni 0,2µM lungo l'asse z, per un totale di 40 immagini a 63X. Le cellule sono state mantenute in KRB-glucosio CaCl₂ 1mM durante l'acquisizione delle immagini. Per l'analisi dell'interazione ER-mitocondri, le foto sono state automaticamente deconvolute, ricostruite in 3D e renderizzate utilizzando VolumeJ (ImageJ). L'interazione è stata quantificata basandosi sul coefficiente di Manders come descritto in precedenza (de Brito and Scorrano, 2008; Manders, 1993).

4.13 Analisi statistica

I dati sono riportati come media ± errore standard. Le differenze statistiche indicate sono le seguenti: “*” = $p < 0,05$; “**” = $p < 0,01$; il test statistico utilizzato è il test *t* di Student. Dove non diversamente indicato, gli esperimenti di Western blot sono stati ripetuti almeno 4 volte per la relativa quantificazione.

4.14 Misura della produzione di ATP in cellule vive

La luminescenza emessa dalla luciferasi è stata misurata come descritto in precedenza (Jouaville et al., 1999). Le cellule HeLa sono state cotransfettate con le sonde luciferasi indirizzate al mitocondrio (mtLUC) o nel citosol (cytLUC) e le proteine di nostro interesse. Il giorno della lettura le cellule sono state perfuse con KRB-glucosio contenente 20µM luciferina e 1mM CaCl₂. La luce emessa da un vetrino transfettato transientemente è di 500-5000 cps, contro un background inferiore a 10cps.

4.15 MAMs

Tutta la procedura deve essere effettuata mantenendo le soluzioni e i campioni in ghiaccio. Abbiamo sacrificato diversi topi ceppo FWB fino a raggiungere 3g di tessuto cerebrale. Eliminare il

sangue con alcuni lavaggi con PBS. Aggiungere 20 ml di buffer di omogeneizzazione e frantumare il tutto con una forbice. Omogenare con potter meccanico per 5 min. Centrifugare a 600g per 5 min a 4°C per eliminare i nuclei e le cellule rimaste intere. Centrifugare il surnatante a 10500g per 15 min: sul fondo si depositeranno i mitocondri, mentre in sospensione otteniamo microsomi, citosol e lisosomi. Per purificare il citosol abbiamo raccolto il surnatante e centrifugato prima a 11000g per 30 min e poi a 100000g per 1,5 ore, eliminando di volta in volta il pellet. I mitocondri sono stati risospesi in 1,6 ml di buffer 1 e frammentati con il potter a mano gentilmente (questo campione rappresenta l'estratto mitocondriale crudo). Centrifugo con 8 ml di percoll 30% in buffer 2 a 95000g per 40 min a 4°C per separare le MAMs dai mitocondri puri. Le MAMs vanno risospese in 15 ml di buffer di omogeneizzazione e lavate a 6300g per 10 min per 2 volte. Il surnatante va centrifugato a 100000g per 1,5 ore. Nel pellet ottenuto ci sono le MAMs pure. I mitocondri vanno messi in 15 ml di buffer di omogeneizzazione e lavati per 2 volte a 6300g per 10 min. Il pellet mitocondriale va prelevato e centrifugato a 12000g per 10 min a 4°C. Nel pellet ci sono i mitocondri puri. Per solubilizzare tutti i campioni ottenuti si utilizza del RIPA buffer.

Buffer utilizzati:

- Buffer di Omogeneizzazione
 - Mannitolo 225mM
 - Saccarosio 75mM
 - Tris HCl 30mM pH 7.4
- Buffer 1
 - Mannitolo 250mM
 - 5mM HEPES
 - 0,5mM EGTA
- Buffer 2
 - 2,052g mannitolo
 - 2,5ml HEPES (0,5M)
 - 0,5ml EGTA (100mM)
 - Aggiungere 35ml di acqua e 15ml Percoll
 - Al momento dell'uso mettere PMSF (1mM finale, 25ul da stock 200mM)
- RIPA BUFFER (250ml)
 - 50mM Tris pH 7.5
 - 150mM NaCl
 - 1% triton
 - 0,1% SDS
 - 1% sodium deoxycholate
 - Aggiungere inibitori delle proteasi al momento dell'uso

Ringraziamenti

Vogliamo ringraziare il Prof. Alessandro Negro dell'Università di Padova per averci fornito i costrutti per l'espressione delle proteine α -sin (compresi i relativi mutanti e le proteine TAT), parkina, DJ-1 e PINK1. Inoltre ringraziamo anche il Dott. Paolo Pinton dell'università di Ferrara che ci ha fornito i costrutti per l'espressione delle proteine p53 e p53 Δ NLS.

5. BIBLIOGRAFIA

- Akundi, R.S., Huang, Z., Eason, J., Pandya, J.D., Zhi, L., Cass, W.A., Sullivan, P.G., and Bueler, H. (2011). Increased mitochondrial calcium sensitivity and abnormal expression of innate immunity genes precede dopaminergic defects in Pink1-deficient mice. *PloS one* 6, e16038.
- Albani, D., Peverelli, E., Rametta, R., Batelli, S., Veschini, L., Negro, A., and Forloni, G. (2004). Protective effect of TAT-delivered alpha-synuclein: relevance of the C-terminal domain and involvement of HSP70. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1713-1715.
- Allen, D.G., and Blinks, J.R. (1978). Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature* 273, 509-513.
- Alves da Costa, C., and Checler, F. (2011). Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? *Cellular signalling* 23, 963-968.
- Ambani, L.M., Van Woert, M.H., and Murphy, S. (1975). Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Archives of neurology* 32, 114-118.
- Andres-Mateos, E., Perier, C., Zhang, L., Blanchard-Fillion, B., Greco, T.M., Thomas, B., Ko, H.S., Sasaki, M., Ischiropoulos, H., Przedborski, S., *et al.* (2007). DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14807-14812.
- Area-Gomez, E., de Groof, A.J., Boldogh, I., Bird, T.D., Gibson, G.E., Koehler, C.M., Yu, W.H., Duff, K.E., Yaffe, M.P., Pon, L.A., *et al.* (2009). Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *The American journal of pathology* 175, 1810-1816.
- Ashley, A.K., Hanneman, W.H., Katoh, T., Moreno, J.A., Pollack, A., Tjalkens, R.B., and Legare, M.E. (2009). Analysis of targeted mutation in DJ-1 on cellular function in primary astrocytes. *Toxicology letters* 184, 186-191.
- Auluck, P.K., Caraveo, G., and Lindquist, S. (2010). alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 211-233.
- Barrero, M.J., Montero, M., and Alvarez, J. (1997). Dynamics of [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. *The Journal of biological chemistry* 272, 27694-27699.
- Barrientos, A., and Moraes, C.T. (1999). Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *The Journal of biological chemistry* 274, 16188-16197.
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., *et al.* (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341-345.
- Beal, M.F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of neurology* 58, 495-505.

- Beilina, A., Van Der Brug, M., Ahmad, R., Kesavapany, S., Miller, D.W., Petsko, G.A., and Cookson, M.R. (2005). Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 5703-5708.
- Bernardi, P., and Azzone, G.F. (1983). Regulation of Ca²⁺ efflux in rat liver mitochondria. Role of membrane potential. *European journal of biochemistry / FEBS* *134*, 377-383.
- Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* *361*, 315-325.
- Berridge, M.J. (2007). Inositol trisphosphate and calcium oscillations. *Biochemical Society symposium*, 1-7.
- Blackinton, J., Lakshminarasimhan, M., Thomas, K.J., Ahmad, R., Greggio, E., Raza, A.S., Cookson, M.R., and Wilson, M.A. (2009). Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1. *The Journal of biological chemistry* *284*, 6476-6485.
- Blinks, J.R. (1972). On the suitability of aequorin as an intracellular calcium detector. *Nihon seirigaku zasshi Journal of the Physiological Society of Japan* *34*, 95-96.
- Bonifati, V., Fabrizio, E., Vanacore, N., De Mari, M., and Meco, G. (1995). Familial Parkinson's disease: a clinical genetic analysis. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* *22*, 272-279.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., *et al.* (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* *299*, 256-259.
- Bradbury, J. (2003). Alpha-synuclein gene triplication discovered in Parkinson's disease. *Lancet neurology* *2*, 715.
- Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *Journal of cell science* *123*, 2527-2532.
- Brandon, M., Baldi, P., and Wallace, D.C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* *25*, 4647-4662.
- Bretaud, S., Allen, C., Ingham, P.W., and Bandmann, O. (2007). p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* *100*, 1626-1635.
- Brini, M. (2004). Ryanodine receptor defects in muscle genetic diseases. *Biochemical and biophysical research communications* *322*, 1245-1255.
- Brini, M. (2008). Calcium-sensitive photoproteins. *Methods* *46*, 160-166.
- Brini, M., and Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiological reviews* *89*, 1341-1378.

- Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Alvarez, J., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1995). Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c). A critical evaluation. *The Journal of biological chemistry* 270, 9896-9903.
- Brini, M., Pasti, L., Bastianutto, C., Murgia, M., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1994). Targeting of aequorin for calcium monitoring in intracellular compartments. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* 9, 177-184.
- Burbulla, L.F., Schelling, C., Kato, H., Rapaport, D., Voitalla, D., Schiesling, C., Schulte, C., Sharma, M., Illig, T., Bauer, P., *et al.* (2010). Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. *Human molecular genetics* 19, 4437-4452.
- Cali, T., Ottolini, D., and Brini, M. (2011). Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Biofactors* 37, 228-240.
- Canet-Aviles, R.M., Wilson, M.A., Miller, D.W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M.J., Ringe, D., Petsko, G.A., and Cookson, M.R. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9103-9108.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 36, 107-260.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetto, F., and Kratzing, C. (1974). The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 6, 361-371.
- Cardenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgo, J., Muller, M., Vais, H., Cheung, K.H., Yang, J., Parker, I., *et al.* (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell* 142, 270-283.
- Chan, C.S., Gertler, T.S., and Surmeier, D.J. (2009). Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* 32, 249-256.
- Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L., Hess, S., and Chan, D.C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human molecular genetics* 20, 1726-1737.
- Chen, D., Gao, F., Li, B., Wang, H., Xu, Y., Zhu, C., and Wang, G. (2010). Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *The Journal of biological chemistry* 285, 38214-38223.
- Chen, M., Sandoval, H., and Wang, J. (2008). Selective mitochondrial autophagy during erythroid maturation. *Autophagy* 4, 926-928.
- Chiesa, A., Rapizzi, E., Tosello, V., Pinton, P., de Virgilio, M., Fogarty, K.E., and Rizzuto, R. (2001). Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem J* 355, 1-12.

- Chinta, S.J., Mallajosyula, J.K., Rane, A., and Andersen, J.K. (2010). Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience letters* *486*, 235-239.
- Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A., and Guo, M. (2006). *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* *441*, 1162-1166.
- Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends in neurosciences* *21*, 249-254.
- Cobbold, P.H., and Lee, J. A. C. (1991). *Aequorin measurements of cytoplasmic free calcium*. (Oxford, England: Oxford Univ. Press.)
- Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature medicine* *4*, 1318-1320.
- Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Williamson, R.E., and Lansbury, P.T., Jr. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 571-576.
- D'Agata, V., Zhao, W., Pascale, A., Zohar, O., Scapagnini, G., and Cavallaro, S. (2002). Distribution of parkin in the adult rat brain. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* *26*, 519-527.
- Dagda, R.K., Cherra, S.J., 3rd, Kulich, S.M., Tandon, A., Park, D., and Chu, C.T. (2009). Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *The Journal of biological chemistry* *284*, 13843-13855.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., and Kostka, M. (2007). Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *27*, 9220-9232.
- Darios, F., Corti, O., Lucking, C.B., Hampe, C., Muriel, M.P., Abbas, N., Gu, W.J., Hirsch, E.C., Rooney, T., Ruberg, M., *et al.* (2003). Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Human molecular genetics* *12*, 517-526.
- de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* *456*, 605-610.
- De Michele, G., Filla, A., Marconi, R., Volpe, G., D'Alessio, A., Scala, R., Ambrosio, G., and Campanella, G. (1995). A genetic study of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission Supplementum* *45*, 21-25.
- de Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alperovitch, A., and Rocca, W.A. (1997). Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *62*, 10-15.

- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 336-340.
- Denton, R.M., and McCormack, J.G. (1985). Physiological role of Ca²⁺ transport by mitochondria. *Nature* 315, 635.
- Denton, R.M., and McCormack, J.G. (1990). Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annual review of physiology* 52, 451-466.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *The Journal of biological chemistry* 283, 9089-9100.
- Di Lisa, F., and Bernardi, P. (2005). Mitochondrial function and myocardial aging. A critical analysis of the role of permeability transition. *Cardiovascular research* 66, 222-232.
- Ding, W.X., Ni, H.M., Li, M., Liao, Y., Chen, X., Stolz, D.B., Dorn, G.W., 2nd, and Yin, X.M. (2010). Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *The Journal of biological chemistry* 285, 27879-27890.
- Duchen, M.R., Surin, A., and Jacobson, J. (2003). Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods Enzymol* 361, 353-389.
- Ellis, C.E., Murphy, E.J., Mitchell, D.C., Golovko, M.Y., Scaglia, F., Barcelo-Coblijn, G.C., and Nussbaum, R.L. (2005). Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. *Molecular and cellular biology* 25, 10190-10201.
- Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmstrom, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H.H., Gasser, T., *et al.* (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 12413-12418.
- Fan, J., Ren, H., Fei, E., Jia, N., Ying, Z., Jiang, P., Wu, M., and Wang, G. (2008a). Sumoylation is critical for DJ-1 to repress p53 transcriptional activity. *FEBS letters* 582, 1151-1156.
- Fan, J., Ren, H., Jia, N., Fei, E., Zhou, T., Jiang, P., Wu, M., and Wang, G. (2008b). DJ-1 decreases Bax expression through repressing p53 transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* 283, 4022-4030.
- Furukawa, K., Matsuzaki-Kobayashi, M., Hasegawa, T., Kikuchi, A., Sugeno, N., Itoyama, Y., Wang, Y., Yao, P.J., Bushlin, I., and Takeda, A. (2006). Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *Journal of neurochemistry* 97, 1071-1077.
- Gandhi, S., Wood-Kaczmar, A., Yao, Z., Plun-Favreau, H., Deas, E., Klupsch, K., Downward, J., Latchman, D.S., Tabrizi, S.J., Wood, N.W., *et al.* (2009). PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell* 33, 627-638.

- Gautier, C.A., Kitada, T., and Shen, J. (2008). Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 11364-11369.
- Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.Y., Rojo, M., Schapira, A.H., and Taanman, J.W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human molecular genetics* *19*, 4861-4870.
- Geisler, S., Holmstrom, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* *12*, 119-131.
- Giaime, E., Sunyach, C., Druon, C., Scarzello, S., Robert, G., Grosso, S., Auburger, P., Goldberg, M.S., Shen, J., Heutink, P., *et al.* (2010). Loss of function of DJ-1 triggered by Parkinson's disease-associated mutation is due to proteolytic resistance to caspase-6. *Cell Death Differ* *17*, 158-169.
- Giorgi, C., Wieckowski, M.R., Pandolfi, P.P., and Pinton, P. (2011). Mitochondria associated membranes (MAMs) as critical hubs for apoptosis. *Communicative & integrative biology* *4*, 334-335.
- Gitler, A.D., Bevis, B.J., Shorter, J., Strathearn, K.E., Hamamichi, S., Su, L.J., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Rochet, J.C., McCaffery, J.M., *et al.* (2008). The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 145-150.
- Greene, J.C., Whitworth, A.J., Kuo, I., Andrews, L.A., Feany, M.B., and Pallanck, L.J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 4078-4083.
- Grigorieff, N. (1999). Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Current opinion in structural biology* *9*, 476-483.
- Gump, J.M., and Dowdy, S.F. (2007). TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med* *13*, 443-448.
- Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P.T., and Surmeier, D.J. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* *468*, 696-700.
- Haque, M.E., Thomas, K.J., D'Souza, C., Callaghan, S., Kitada, T., Slack, R.S., Fraser, P., Cookson, M.R., Tandon, A., and Park, D.S. (2008). Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 1716-1721.
- Hardy, J., Lewis, P., Revesz, T., Lees, A., and Paisan-Ruiz, C. (2009). The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Current opinion in genetics & development* *19*, 254-265.
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M., and Masliah, E. (2001). beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron* *32*, 213-223.

- Hayashi, T., Ishimori, C., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Kim, Y.C., Maita, H., Maita, C., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S.M. (2009). DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochemical and biophysical research communications* *390*, 667-672.
- Heeman, B., Van den Haute, C., Aelvoet, S.A., Valsecchi, F., Rodenburg, R.J., Reumers, V., Debyser, Z., Callewaert, G., Koopman, W.J., Willems, P.H., *et al.* (2011). Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance. *Journal of cell science* *124*, 1115-1125.
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernandez, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolanos, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature cell biology* *11*, 747-752.
- Hettiarachchi, N.T., Parker, A., Dallas, M.L., Pennington, K., Hung, C.C., Pearson, H.A., Boyle, J.P., Robinson, P., and Peers, C. (2009). alpha-Synuclein modulation of Ca²⁺ signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Journal of neurochemistry* *111*, 1192-1201.
- Hinkle, D.A., Mullett, S.J., Gabris, B.E., and Hamilton, R.L. (2011). DJ-1 expression in glioblastomas shows positive correlation with p53 expression and negative correlation with epidermal growth factor receptor amplification. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* *31*, 29-37.
- Huls, S., Hogen, T., Vassallo, N., Danzer, K.M., Hengerer, B., Giese, A., and Herms, J. (2011). AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced alpha-synuclein oligomers. *Journal of neurochemistry* *117*, 868-878.
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., and Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* *14*, 467-475.
- Jakes, R., Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1994). Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS letters* *345*, 27-32.
- Jin, J., Li, G.J., Davis, J., Zhu, D., Wang, Y., Pan, C., and Zhang, J. (2007). Identification of novel proteins associated with both alpha-synuclein and DJ-1. *Mol Cell Proteomics* *6*, 845-859.
- Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A., and Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 13807-13812.
- Junn, E., Jang, W.H., Zhao, X., Jeong, B.S., and Mouradian, M.M. (2009). Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. *J Neurosci Res* *87*, 123-129.
- Kahle, P.J. (2008). alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta neuropathologica* *115*, 87-95.
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A.K., Wender, N., Hegemann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., *et al.* (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *The EMBO journal* *29*, 3571-3589.

- Kanki, T., and Klionsky, D.J. (2010). The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Molecular microbiology* 75, 795-800.
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., and Klionsky, D.J. (2009). Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Developmental cell* 17, 98-109.
- Karpinar, D.P., Balija, M.B., Kugler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.Y., Taschenberger, G., Falkenburger, B.H., Heise, H., *et al.* (2009). Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *The EMBO journal* 28, 3256-3268.
- Kim, R.H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G.C., DeLuca, C., Liepa, J., Zhou, L., Snow, B., *et al.* (2005). DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer cell* 7, 263-273.
- Kim, Y., Park, J., Kim, S., Song, S., Kwon, S.K., Lee, S.H., Kitada, T., Kim, J.M., and Chung, J. (2008). PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 377, 975-980.
- Kim, Y.C., Kitaura, H., Iguchi-Arigo, S.M., and Ariga, H. (2010). DJ-1, an oncogene and causative gene for familial Parkinson's disease, is essential for SV40 transformation in mouse fibroblasts through up-regulation of c-Myc. *FEBS letters* 584, 3891-3895.
- Kim, Y.C., Kitaura, H., Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M., and Ariga, H. (2009). Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN. *International journal of oncology* 35, 1331-1341.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360-364.
- Kish, S.J., Morito, C., and Hornykiewicz, O. (1985). Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neuroscience letters* 58, 343-346.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605-608.
- Klein, C., and Schlossmacher, M.G. (2006). The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nature clinical practice Neurology* 2, 136-146.
- Krebiel, G., Ruckerbauer, S., Burbulla, L.F., Kieper, N., Maurer, B., Waak, J., Wolburg, H., Gizatullina, Z., Gellerich, F.N., Voitalla, D., *et al.* (2010). Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PloS one* 5, e9367.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics* 18, 106-108.

- Kumaran, R., Vandrovcova, J., Luk, C., Sharma, S., Renton, A., Wood, N.W., Hardy, J.A., Lees, A.J., and Bandopadhyay, R. (2009). Differential DJ-1 gene expression in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 36, 393-400.
- Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., and Matsumoto, T. (2006a). Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. *Biochemical and biophysical research communications* 348, 787-793.
- Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., Shono, M., Akaike, M., Azuma, H., and Matsumoto, T. (2006b). Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Human molecular genetics* 15, 883-895.
- Langston, J.W. (1987). MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. *European neurology* 26 Suppl 1, 2-10.
- Lashuel, H.A., Petre, B.M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R.J., Walz, T., and Lansbury, P.T., Jr. (2002). Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol* 322, 1089-1102.
- Lasorsa, F.M., Pinton, P., Palmieri, L., Fiermonte, G., Rizzuto, R., and Palmieri, F. (2003). Recombinant expression of the Ca(2+)-sensitive aspartate/glutamate carrier increases mitochondrial ATP production in agonist-stimulated Chinese hamster ovary cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 38686-38692.
- Lazzarini, A.M., Myers, R.H., Zimmerman, T.R., Jr., Mark, M.H., Golbe, L.I., Sage, J.I., Johnson, W.G., and Duvoisin, R.C. (1994). A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology* 44, 499-506.
- Leng, Y., and Chuang, D.M. (2006). Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 7502-7512.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., *et al.* (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395, 451-452.
- Lev, N., Ickowicz, D., Melamed, E., and Offen, D. (2008). Oxidative insults induce DJ-1 upregulation and redistribution: implications for neuroprotection. *Neurotoxicology* 29, 397-405.
- Levy, O.A., Malagelada, C., and Greene, L.A. (2009). Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 14, 478-500.
- Li, H.M., Niki, T., Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M., and Ariga, H. (2005a). Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radic Res* 39, 1091-1099.
- Li, W., West, N., Colla, E., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Marsh, L., Dawson, T.M., Jakala, P., Hartmann, T., Price, D.L., *et al.* (2005b). Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked

- mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 2162-2167.
- Li, W.W., Yang, R., Guo, J.C., Ren, H.M., Zha, X.L., Cheng, J.S., and Cai, D.F. (2007). Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport* *18*, 1543-1546.
- Lin, W., and Kang, U.J. (2008). Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. *Journal of neurochemistry* *106*, 464-474.
- Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., Yang, H., Ueda, K., Chan, P., and Yu, S. (2009). alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neuroscience letters* *454*, 187-192.
- Loeb, V., Yakunin, E., Saada, A., and Sharon, R. (2010). The transgenic overexpression of alpha-synuclein and not its related pathology associates with complex I inhibition. *The Journal of biological chemistry* *285*, 7334-7343.
- Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R.J., and Wilkinson, K.D. (1990). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *The Journal of pathology* *161*, 153-160.
- Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lammermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., *et al.* (2009). Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *The Journal of biological chemistry* *284*, 22938-22951.
- Lytton, J. (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J* *406*, 365-382.
- Mammucari, C., Patron, M., Granatiero, V., and Rizzuto, R. (2011). Molecules and roles of mitochondrial calcium signaling. *Biofactors* *37*, 219-227.
- Manders, E.M., Verbeek, F. J. & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images *J Microsc* *169*, 375-382.
- Maraganore, D.M., Harding, A.E., and Marsden, C.D. (1991). A clinical and genetic study of familial Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* *6*, 205-211.
- Marongiu, R., Spencer, B., Crews, L., Adame, A., Patrick, C., Trejo, M., Dallapiccola, B., Valente, E.M., and Masliah, E. (2009). Mutant Pink1 induces mitochondrial dysfunction in a neuronal cell model of Parkinson's disease by disturbing calcium flux. *Journal of neurochemistry* *108*, 1561-1574.
- Marsault, R., Murgia, M., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1997). Domains of high Ca²⁺ beneath the plasma membrane of living A7r5 cells. *The EMBO journal* *16*, 1575-1581.
- Martin, L.J., Pan, Y., Price, A.C., Sterling, W., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., and Lee, M.K. (2006). Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial

degeneration and cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 41-50.

Martins, L.M., Morrison, A., Klupsch, K., Fedele, V., Moiso, N., Teismann, P., Abuin, A., Grau, E., Geppert, M., Livi, G.P., *et al.* (2004). Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Molecular and cellular biology* 24, 9848-9862.

Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., *et al.* (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189, 211-221.

Matsumine, H., Saito, M., Shimoda-Matsubayashi, S., Tanaka, H., Ishikawa, A., Nakagawa-Hattori, Y., Yokochi, M., Kobayashi, T., Igarashi, S., Takano, H., *et al.* (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *American journal of human genetics* 60, 588-596.

McNaught, K.S., Olanow, C.W., Halliwell, B., Isacson, O., and Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nature reviews Neuroscience* 2, 589-594.

Miller, R.L., James-Kracke, M., Sun, G.Y., and Sun, A.Y. (2009). Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochemical research* 34, 55-65.

Mitchell, P. (1972). Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. *Journal of bioenergetics* 3, 5-24.

Mitsumoto, A., Nakagawa, Y., Takeuchi, A., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Takanezawa, Y. (2001). Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free radical research* 35, 301-310.

Morais, V.A., Verstreken, P., Roethig, A., Smet, J., Snellinx, A., Vanbrabant, M., Haddad, D., Frezza, C., Mandemakers, W., Vogt-Weisenhorn, D., *et al.* (2009). Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med* 1, 99-111.

Muftuoglu, M., Elibol, B., Dalmizrak, O., Ercan, A., Kulaksiz, G., Ogus, H., Dalkara, T., and Ozer, N. (2004). Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19, 544-548.

Mullett, S.J., and Hinkle, D.A. (2011). DJ-1 deficiency in astrocytes selectively enhances mitochondrial Complex I inhibitor-induced neurotoxicity. *Journal of neurochemistry* 117, 375-387.

Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S.M., and Ariga, H. (1997). DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochemical and biophysical research communications* 231, 509-513.

Nakamura, K., Nemani, V.M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J.M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., *et al.* (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 286, 20710-20726.

- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* *183*, 795-803.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology* *8*, e1000298.
- Nicholls, D.G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* *38*, 311-317.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Developmental cell* *17*, 87-97.
- Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., *et al.* (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* *44*, 595-600.
- Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., and Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* *279*, 18614-18622.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., *et al.* (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 436-441.
- Pankratz, N., Wilk, J.B., Latourelle, J.C., DeStefano, A.L., Halter, C., Pugh, E.W., Doheny, K.F., Gusella, J.F., Nichols, W.C., Foroud, T., *et al.* (2009). Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Human genetics* *124*, 593-605.
- Papa, S., Sardanelli, A.M., Capitano, N., and Piccoli, C. (2009). Mitochondrial respiratory dysfunction and mutations in mitochondrial DNA in PINK1 familial parkinsonism. *J Bioenerg Biomembr* *41*, 509-516.
- Parihar, M.S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., and Ghafourifar, P. (2008). Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* *65*, 1272-1284.
- Parihar, M.S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., and Ghafourifar, P. (2009). Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* *41*, 2015-2024.
- Paterna, J.C., Leng, A., Weber, E., Feldon, J., and Bueler, H. (2007). DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *15*, 698-704.
- Perier, C., Tieu, K., Guegan, C., Caspersen, C., Jackson-Lewis, V., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hirano, M., Przedborski, S., and Vila, M. (2005). Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 19126-19131.

- Periquet, M., Fulga, T., Myllykangas, L., Schlossmacher, M.G., and Feany, M.B. (2007). Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 3338-3346.
- Perocchi, F., Gohil, V.M., Girgis, H.S., Bao, X.R., McCombs, J.E., Palmer, A.E., and Mootha, V.K. (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake. *Nature* 467, 291-296.
- Petit, A., Kawarai, T., Paitel, E., Sanjo, N., Maj, M., Scheid, M., Chen, F., Gu, Y., Hasegawa, H., Salehi-Rad, S., *et al.* (2005). Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *The Journal of biological chemistry* 280, 34025-34032.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., and Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407-6418.
- Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal* 17, 5298-5308.
- Plante-Bordeneuve, V., Taussig, D., Thomas, F., Ziegler, M., and Said, G. (1995). A clinical and genetic study of familial cases of Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* 133, 164-172.
- Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N., *et al.* (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nature cell biology* 9, 1243-1252.
- Pogson, J.H., Ivatt, R.M., and Whitworth, A.J. (2011). Molecular mechanisms of PINK1-related neurodegeneration. *Current neurology and neuroscience reports* 11, 283-290.
- Poirier, J., Dea, D., Baccichet, A., and Thiffault, C. (1994). Superoxide dismutase expression in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 738, 116-120.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., *et al.* (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- Pridgeon, J.W., Olzmann, J.A., Chin, L.S., and Li, L. (2007). PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS biology* 5, e172.
- Rahman-Roblick, R., Hellman, U., Becker, S., Bader, F.G., Auer, G., Wiman, K.G., and Roblick, U.J. (2008). Proteomic identification of p53-dependent protein phosphorylation. *Oncogene* 27, 4854-4859.
- Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M.R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., and Rizzuto, R. (2002). Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* 159, 613-624.
- Ricchelli, F., Sileikyte, J., and Bernardi, P. (2011). Shedding light on the mitochondrial permeability transition. *Biochimica et biophysica acta* 1807, 482-490.

- Rizzuto, R., Brini, M., Bastianutto, C., Marsault, R., and Pozzan, T. (1995). Photoprotein-mediated measurement of calcium ion concentration in mitochondria of living cells. *Methods Enzymol* 260, 417-428.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744-747.
- Rodriguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R.T., and Lemasters, J.J. (2006). Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy* 2, 39-46.
- Romo, R., and Schultz, W. (1990). Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to active touch during self-initiated arm movements. *Journal of neurophysiology* 63, 592-606.
- Sandebring, A., Dehvari, N., Perez-Manso, M., Thomas, K.J., Karpilovski, E., Cookson, M.R., Cowburn, R.F., and Cedazo-Minguez, A. (2009). Parkin deficiency disrupts calcium homeostasis by modulating phospholipase C signalling. *The FEBS journal* 276, 5041-5052.
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., and Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454, 232-235.
- Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., *et al.* (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19500-19505.
- Sha, D., Chin, L.S., and Li, L. (2010). Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB signaling. *Human molecular genetics* 19, 352-363.
- Shimomura, O., and Johnson, F.H. (1972). Structure of the light-emitting moiety of aequorin. *Biochemistry* 11, 1602-1608.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology* 59, 223-239.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., *et al.* (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature genetics* 25, 302-305.
- Shinbo, Y., Taira, T., Niki, T., Iguchi-Arigo, S.M., and Ariga, H. (2005). DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3. *International journal of oncology* 26, 641-648.
- Shoshan-Barmatz, V., Zalk, R., Gincel, D., and Vardi, N. (2004). Subcellular localization of VDAC in mitochondria and ER in the cerebellum. *Biochimica et biophysica acta* 1657, 105-114.
- Shtifman, A., Zhong, N., Lopez, J.R., Shen, J., and Xu, J. (2011). Altered Ca²⁺ homeostasis in the skeletal muscle of DJ-1 null mice. *Neurobiology of aging* 32, 125-132.

- Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E.M., and Casari, G. (2005). Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Human molecular genetics* *14*, 3477-3492.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., *et al.* (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* *302*, 841.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* *388*, 839-840.
- Steiner, J.A., Angot, E., and Brundin, P. (2011). A deadly spread: cellular mechanisms of alpha-synuclein transfer. *Cell Death Differ* *18*, 1425-1433.
- Stichel, C.C., Augustin, M., Kuhn, K., Zhu, X.R., Engels, P., Ullmer, C., and Lubbert, H. (2000). Parkin expression in the adult mouse brain. *The European journal of neuroscience* *12*, 4181-4194.
- Stichel, C.C., Zhu, X.R., Bader, V., Linnartz, B., Schmidt, S., and Lubbert, H. (2007). Mono- and double-mutant mouse models of Parkinson's disease display severe mitochondrial damage. *Human molecular genetics* *16*, 2377-2393.
- Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., *et al.* (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Human molecular genetics* *14*, 2099-2111.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* *175*, 901-911.
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., and Hajnoczky, G. (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *The EMBO journal* *18*, 6349-6361.
- Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., *et al.* (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology* *10*, 676-687.
- Traba, J., Satrustegui, J., and del Arco, A. (2011). Adenine nucleotide transporters in organelles: novel genes and functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *68*, 1183-1206.
- Tretter, L., Sipos, I., and Adam-Vizi, V. (2004). Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochemical research* *29*, 569-577.
- Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1998). Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Archives of neurology* *55*, 151-152.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., *et al.* (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* *27*, 433-446.

Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., *et al.* (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* *304*, 1158-1160.

Valente, E.M., Bentivoglio, A.R., Dixon, P.H., Ferraris, A., Ialongo, T., Frontali, M., Albanese, A., and Wood, N.W. (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *American journal of human genetics* *68*, 895-900.

Valente, E.M., Brancati, F., Ferraris, A., Graham, E.A., Davis, M.B., Breteler, M.M., Gasser, T., Bonifati, V., Bentivoglio, A.R., De Michele, G., *et al.* (2002). PARK6-linked parkinsonism occurs in several European families. *Annals of neurology* *51*, 14-18.

Van Den Eeden, S.K., Tanner, C.M., Bernstein, A.L., Fross, R.D., Leimpeter, A., Bloch, D.A., and Nelson, L.M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American journal of epidemiology* *157*, 1015-1022.

van Duijn, C.M., Dekker, M.C., Bonifati, V., Galjaard, R.J., Houwing-Duistermaat, J.J., Snijders, P.J., Testers, L., Breedveld, G.J., Horstink, M., Sandkuijl, L.A., *et al.* (2001). Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *American journal of human genetics* *69*, 629-634.

Vasseur, S., Afzal, S., Tardivel-Lacombe, J., Park, D.S., Iovanna, J.L., and Mak, T.W. (2009). DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 1111-1116.

Vasseur, S., Afzal, S., Tomasini, R., Guillaumond, F., Tardivel-Lacombe, J., Mak, T.W., and Iovanna, J.L. (2011). Consequences of DJ-1 upregulation following p53 loss and cell transformation. *Oncogene*.

Vekrellis, K., Rideout, H.J., and Stefanis, L. (2004). Neurobiology of alpha-synuclein. *Molecular neurobiology* *30*, 1-21.

Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E., Rideout, H.J., and Stefanis, L. (2011). Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders. *Lancet neurology* *10*, 1015-1025.

Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., *et al.* (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 378-383.

Wang, H., Song, P., Du, L., Tian, W., Yue, W., Liu, M., Li, D., Wang, B., Zhu, Y., Cao, C., *et al.* (2011a). Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *The Journal of biological chemistry* *286*, 11649-11658.

Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., Lavoie, M.J., and Schwarz, T.L. (2011b). PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility. *Cell* *147*, 893-906.

- Weihofen, A., Thomas, K.J., Ostaszewski, B.L., Cookson, M.R., and Selkoe, D.J. (2009). Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* *48*, 2045-2052.
- Werner, C.J., Heyny-von Haussen, R., Mall, G., and Wolf, S. (2008). Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteome science* *6*, 8.
- West, A.B., and Maidment, N.T. (2004). Genetics of parkin-linked disease. *Human genetics* *114*, 327-336.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., *et al.* (2011). In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 4194-4199.
- Winslow, A.R., Chen, C.W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D.E., Peden, A.A., Lichtenberg, M., Menzies, F.M., Ravikumar, B., Imarisio, S., *et al.* (2010). alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol* *190*, 1023-1037.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., and Wood, N.W. (2006). Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol Med* *12*, 521-528.
- Xu, J., Zhong, N., Wang, H., Elias, J.E., Kim, C.Y., Woldman, I., Pifl, C., Gygi, S.P., Geula, C., and Yankner, B.A. (2005). The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Human molecular genetics* *14*, 1231-1241.
- Yang, H., Zhou, X., Liu, X., Yang, L., Chen, Q., Zhao, D., Zuo, J., and Liu, W. (2011). Mitochondrial dysfunction induced by knockdown of mortalin is rescued by Parkin. *Biochemical and biophysical research communications* *410*, 114-120.
- Yang, W., Chen, L., Ding, Y., Zhuang, X., and Kang, U.J. (2007). Paraquat induces dopaminergic dysfunction and proteasome impairment in DJ-1-deficient mice. *Human molecular genetics* *16*, 2900-2910.
- Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H., and Lu, B. (2006). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 10793-10798.
- Yao, Z., Gandhi, S., Burchell, V.S., Plun-Favreau, H., Wood, N.W., and Abramov, A.Y. (2012). Cell metabolism affects selective vulnerability in PINK1-associated Parkinson's disease. *Journal of cell science*.
- Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2005). Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Molecular biology of the cell* *16*, 1593-1605.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Ates, B., *et al.* (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology* *55*, 164-173.

- Zhang, J., and Ney, P.A. (2008). NIX induces mitochondrial autophagy in reticulocytes. *Autophagy* 4, 354-356.
- Zhang, J., and Ney, P.A. (2009). Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell death and differentiation* 16, 939-946.
- Zhang, L., Shimoji, M., Thomas, B., Moore, D.J., Yu, S.W., Marupudi, N.I., Torp, R., Torgner, I.A., Ottersen, O.P., Dawson, T.M., *et al.* (2005). Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Human molecular genetics* 14, 2063-2073.
- Zhang, L., Zhang, C., Zhu, Y., Cai, Q., Chan, P., Ueda, K., Yu, S., and Yang, H. (2008). Semi-quantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain research* 1244, 40-52.
- Zhang, Z.X., and Roman, G.C. (1993). Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology* 12, 195-208.
- Zhong, N., and Xu, J. (2008). Synergistic activation of the human MnSOD promoter by DJ-1 and PGC-1alpha: regulation by SUMOylation and oxidation. *Human molecular genetics* 17, 3357-3367.
- Zhou, C., Huang, Y., Shao, Y., May, J., Prou, D., Perier, C., Dauer, W., Schon, E.A., and Przedborski, S. (2008). The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 12022-12027.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., *et al.* (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44, 601-607.
- Ziviani, E., Tao, R.N., and Whitworth, A.J. (2010). *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5018-5023.