



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa : Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali

Scuola di Dottorato di Ricerca in: BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE
Indirizzo: BIOCHIMICA E BIOFISICA

CICLO XXII

FORMAZIONE DI COMPLESSI DELLA PROTEINA MITOCONDRIALE
OPA 1 NEL MIOCARDIO ESPOSTO A STRESS OSSIDATIVO E
CARATTERIZZAZIONE DI MUTANTI IN RESIDUI CISTEINICI

Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Maria Katia Sorgato

Supervisore: Ch.mo Prof. Fabio Di Lisa

Dottoranda: Martina Semenzato

31 gennaio 2010

INDICE

ABBREVIAZIONI

1	Sommario.....	1
1	Summary.....	3
2	Introduzione.....	5
2.1	Specie reattive dell'ossigeno (ROS).....	7
2.2	Meccanismo di danno da ROS.....	9
2.3	Stress ossidativo.....	9
2.4	Danno ossidativo alle proteine.....	10
2.5	Ossidazione dello scheletro proteico.....	11
2.6	Frammentazione proteica.....	13
2.6.1	Ossidazione della catena laterale degli aminoacidi.....	13
2.6.2	Ossidazione di residui aminoacidici contenenti solfuri.....	13
2.7	La catena respiratoria mitocondriale e la produzione di specie reattive dell'ossigeno.....	14
2.8	I mitocondri come bersaglio di ROS.....	15
2.9	La morfologia dei mitocondri.....	16
2.10	Fusione e fissione mitocondriale.....	17
2.11	Fusione e fissione nell'apoptosi.....	18
2.12	Proteine regolatrici della morfologia mitocondriale.....	19
2.13	OPA 1.....	20
2.13.1	Funzioni della proteina OPA 1.....	22
3	SCOPO DELLA TESI.....	25
4	MATERIALI E METODI.....	27
4.1	Colture cellulari.....	27
4.1.1	Protocollo di congelamento.....	28
4.1.2	Protocollo di scongelamento.....	28
4.1.3	Coating di gelatina/fibronectina.....	28
4.2	Protocolli sperimentali per il trattamento delle cellule.....	28
4.2.1	Trattamento con H ₂ O ₂ e lisi cellulare.....	28
4.2.2	Transfezione transiente.....	29
4.2.3	Trattamento con H ₂ O ₂ di cellule trasfettate con il plasmide MitoRed.....	29
4.3	Immunofluorescenza.....	30
4.3.1	Analisi delle cellule HL-1 e MEF mediante microscopia.....	30
4.4	Trattamento di cuore isolato di ratto.....	30
4.4.1	Condizioni di perfusione.....	31
4.5	Isolamento di mitocondri da cuore di ratto.....	32
4.5.1	Determinazione della concentrazione proteica.....	32
4.5.2	Rilascio di citocromo c da mitocondri isolati.....	33
4.6	Immuno-elettroforesi.....	33
4.6.1	Preparazione di omogenato da tessuto di cuore di ratto.....	33
4.6.2	Determinazione della concentrazione proteica.....	34

4.6.3	Preparazione di gel di poliacrilamide (Laemmli, 1970a)	34
4.6.4	Corsa elettroforetica.....	35
4.6.5	Preparazione di estratti proteici per la corsa elettroforetica.....	35
4.6.6	Analisi delle proteine mediante elettroforesi redox.....	35
4.6.7	Prima dimensione	36
4.6.8	Seconda dimensione	36
4.6.9	Immunoblot da SDS-PAGE.....	36
4.6.10	Colorazione con Rosso Ponceau.....	37
4.6.11	Saturazione.....	37
4.6.12	Incubazione con anticorpi.....	37
4.6.13	Rivelazione per mezzo di chemiluminescenza	38
4.7	Analisi di proteine mediante Blue Native page.....	38
4.8	Ceppi batterici e mezzi di coltura	39
4.9	Plasmide utilizzato	40
4.9.1	Preparazione del plasmide pMSCV da <i>E. Coli</i> su larga scala	40
4.9.2	Preparazione del plasmide pMSCV da <i>E. Coli</i> su piccola scala.....	41
4.10	Reazione a catena della polimerasi (PCR).....	42
4.11	Corsa elettroforetica di DNA su gel di agarosio.....	43
4.12	Mutagenesi del gene <i>Opa 1</i> sul plasmide pMSCV	44
4.12.1	Taglio enzimatico del DNA con l'endonucleasi di restrizione.....	44
4.12.2	Defosforilazione del plasmide pMSCV	45
4.12.3	Ligazione	45
4.12.4	Preparazione di batteri chimico competenti DH10B.....	45
4.12.5	Trasformazione batterica <i>E. Coli</i> DH10B.....	46
4.13	Mutagenesi sito diretta mediante kit commerciale QuickChange II XL.....	46
4.13.1	Trasformazione di batteri <i>E. Coli</i> X10 Gold ultracompetenti.....	47
4.14	Purificazione da gel di agarosio e da prodotto di PCR di frammenti di DNA ...	47
4.15	<i>Screening</i> dei plasmidi ricombinanti mediante restrizione.....	48
4.16	Preparazione dei campioni per il sequenziamento.....	48
4.17	Produzione di vettori Lentivirali.....	49
5	RISULTATI E DISCUSSIONE	51
5.1	Effetto dello stress ossidativo sulla proteina OPA-1.....	51
5.2	Identificazione di complessi proteici di OPA 1 nella linea cellulare HL-1 e variazione della dinamica mitocondriale in seguito a stress ossidativo.....	56
5.3	Identificazione di complessi proteici di OPA 1 nella linea cellulare MEF.....	60
5.4	Identificazione di ipotetici residui cisteinici coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intermolecolari.....	61
5.5	Progettazione di mutanti a livello di residui cisteinici della proteina OPA1.....	63
5.6	Generazione di cloni stabili esprimenti la proteina OPA1 mutata.....	66
5.7	Analisi della morfologia mitocondriale nei cloni ottenuti in seguito a trasfezione virale.....	67
5.8	Formazione dei complessi proteici di OPA 1 e variazione della dinamica mitocondriale in seguito a stress ossidativo nei cloni cellulari.....	68
6	CONCLUSIONI	73
7	BIBLIOGRAFIA	79

ABBREVIAZIONI

AIF : Apoptosis inducing factor

BSA : Albumina di siero bovino

D.O. : Densità ottica

DHE : Diidrossietidina

DMSO : Dimetilsolfossido

ECL : Chemiluminescenza elettrogene rata

EDTA : Acido etilendiaminotetracetico

H₂O₂ : Acqua ossigenata

HRP : Perossidasi di rafano

kDa : Kilo Dalton

MAO : Monoaminossidasi

NEM : N-etilmaleimmide

PCR : Reazione a catena della polimerasi

PBS : Tampone Salino Solfato

PTP : Poro di transizione della permeabilità mitocondriale

ROS : Specie reattive dell'ossigeno

SDS : Sodio Dodecil Solfato

SDS-PAGE : Elettroforesi su gel di poliacrilamide condotta in presenza di SDS

TEMED : N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

1. SOMMARIO

Il cuore è particolarmente soggetto a disfunzioni mitocondriali e numerose cardiomiopatie sono associate ad un anomalo metabolismo mitocondriale o ad alterazioni bioenergetiche mitocondriali.

Studi recenti hanno messo in evidenza come l'attività dei mitocondri e le vie di trasduzione del segnale cellulare influenzino la morfologia dei mitocondri, ad esempio, la frammentazione della rete mitocondriale è correlata al processo di apoptosi. La proteina OPA 1, GTPasi appartenente alla famiglia delle dinamine, è coinvolta nel processo di fusione della membrana interna mitocondriale e nel mantenimento della struttura delle *cristae* interne mitocondriali. Tuttavia sono necessari maggiori studi atti a contribuire ad una maggiore comprensione delle proteine e dei meccanismi alla base delle funzionalità di OPA 1. Nel presente lavoro di tesi è stato studiato l'effetto dello stress ossidativo sulla proteina mitocondriale OPA 1 nel cuore, dato che i mitocondri sono sede di produzione e bersaglio delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Inizialmente, utilizzando cuori di ratto isolati e perfusi *ex-vivo*, è stato valutato l'effetto di ischemia/riperfusion e perfusione con perossido di idrogeno (H_2O_2) sulla proteina OPA 1. Nei campioni trattati è stata osservata la formazione di complessi ad alto peso molecolare (high molecular weight, HMW) della proteina in esame. In condizioni riducenti, tali complessi vengono disgregati. Questi risultati indicano che in condizioni di forte stress ossidativo con H_2O_2 si ha l'aggregazione di OPA 1 e che nella formazione dell'aggregato è coinvolta la formazione di ponti disolfuro.

In seguito, mediante Blue Native-PAGE (BN-PAGE), è stata eseguita un'analisi dei complessi proteici a partire da mitocondri isolati da cuore di ratto in condizioni normossiche e da cuori perfusi con H_2O_2 . L'analisi ha dimostrato che OPA 1 aggrega in complessi di diverso peso molecolare in condizioni native.

La formazione del complesso di OPA 1 è stata analizzata sia cellule HL-1, una linea di cardiomiociti da atrio murino, che in fibroblasti embrionali murini (mouse embryonic fibroblasts, MEFs). Al fine di indurre stress ossidativo le cellule sono state incubate con 1 mM H_2O_2 per 2 ore. Il complesso di OPA 1 scompare in condizioni riducenti, confermando la formazione di ponti disolfuro intermolecolari. Inoltre, in cellule HL-1 incubate con concentrazioni crescenti di H_2O_2 è stata osservata frammentazione della rete mitocondriale.

Ci siamo proposti di individuare quali fossero i residui cisteinici coinvolti nella formazione del ponte disolfuro. La struttura della proteina OPA 1 non è stata determinata né mediante NMR né mediante tecnica cristallografica.

In collaborazione con il Prof. S. Moro (Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Padova) è stata ipotizzata la struttura 3D della proteina mediante *homology modelling* al fine di caratterizzare quali fossero i residui cisteinici esposti sulla superficie proteica. In questo modo le cisteine 853, 856 e 874 sono stati individuati come residui più probabilmente coinvolti nella formazione del complesso di OPA 1.

Per confermare questa ipotesi, sono stati eseguiti degli esperimenti di mutagenesi sito-diretta a partire da un costrutto plasmidico contenente la sequenza genica per l'isoforma 1 umana del gene *Opal*. Mediante questa tecnica sono stati ottenuti plasmidi mutati a livello delle singole cisteine 853 (C853S) e 874 (C874S), ed un doppio mutante cisteina 853-6 (C853-6S). I cloni sono stati sequenziati per confermare le avvenute mutazioni. Sono stati prodotti vettori lentivirali contenenti i plasmidi mutagenizzati al fine di esprimere stabilmente la proteina di interesse nella linea cellulare MEF *OPA 1*^{-/-} (gentilmente fornita dal Prof. L. Scorrano). Sono state ottenute linee cellulari esprimenti la proteina OPA 1 mutata a livello del singolo residuo cisteinico 853 e dei residui 853-6, mentre non è stata ottenuta la linea esprimente la proteina mutata in C874S.

È stata quindi valutata la morfologia mitocondriale nelle linee cellulari ottenute. Le cellule C853-6S presentano mitocondri disgregati con un fenotipo simile alla linea MEF *OPA 1*^{-/-}; al contrario, nelle cellule esprimenti la proteina OPA 1 mutata a livello del residuo 853, si verifica il ripristino del fenotipo di fusione mitocondriale.

Al fine di chiarire la relazione tra l'aggregazione di OPA 1 e la formazione dei ponti disolfuro, le cellule sono state incubate con H₂O₂. La formazione del complesso di OPA 1 risulta inibita in ambedue le linee cellulari contenenti la proteina mutata. Le cellule C853S sono state trattate con H₂O₂ per verificare la correlazione tra l'aggregazione della proteina in esame e il processo di fissione mitocondriale. I cloni C853S completano il processo di fissione mitocondriale in un tempo doppio rispetto alla linea MEF WT.

Per concludere, in condizioni di elevato stress ossidativo la proteina OPA 1 è esposta ad ossidazione che ne modifica lo stato di aggregazione. Tale processo è correlato ad una diminuzione della fusione mitocondriale e, nelle cellule HL-1, ad un aumentato rilascio di citocromo c. Il meccanismo di aggregazione della proteina è stato stabilito mediante mutagenesi sito specifica che mette in luce il ruolo del residuo cisteinico 853.

1. SUMMARY

The heart is especially vulnerable to mitochondrial derangements. In fact, many cardiomyopathies are caused by anomalous mitochondrial metabolism or alterations of mitochondrial bioenergetics. The involvement of mitochondria in cardiac diseases is likely to be extended to structural changes, since mitochondrial activity and cellular signaling are tightly linked with mitochondrial morphology. A major example of this link is provided by the relationship between mitochondrial fragmentation and the progression of apoptosis. Among the proteins involved in mitochondrial dynamics, the dynamin-like GTPase Optic Atrophy 1 (OPA 1) is required for mitochondrial inner membrane fusion and maintenance of normal *cristae* structure. The research activity of this thesis was aimed at both investigating whether OPA 1 is altered in hearts subjected to ischemia and reperfusion and elucidating the relationships between OPA 1 changes and alterations in mitochondrial morphology. Due to the established role of mitochondria in generating reactive oxygen species, oxidative stress was investigated as a crucial mechanism altering OPA 1 structure and function. The susceptibility of OPA 1 to oxidation was initially characterized in intact hearts, cardiomyoblasts and isolated mitochondria. In isolated rat hearts perfused with hydrogen peroxide (H_2O_2) or subjected to ischemia and reperfusion OPA 1 was found to undergo the formation of high molecular weight (HMW) bands that were barely detectable in normoxic hearts. Since these HMW bands were only observed in electrophoreses carried out under non-reducing conditions, their formation reflected the oxidation of vicinal cysteinyl residues resulting in the generation of disulphide cross-bridges.

In mitochondria isolated from heart perfused with H_2O_2 , Blue Native-PAGE (BN-PAGE) analysis displayed the aggregation of OPA 1 in various complexes with high molecular weight (ranging from xx to xx). These complexes were not present in mitochondria isolated from normoxic rat hearts. Then OPA 1 complex formation was analyzed both in HL-1, a proliferating atrial cardiomyocytes derived from mouse AT-1 cells, and in mouse embryonic fibroblasts (MEFs), as a model cell line. Oxidative stress caused by incubation with H_2O_2 resulted in the formation of OPA 1 complexes that disappeared under reducing conditions, confirming the presence of intermolecular cross-bridges. Notably, under the same experimental condition causing OPA 1 aggregation (i.e., incubation with increasing concentration of H_2O_2) a fragmentation of mitochondrial network was observed in HL-1 cells suggesting that oxidation of cysteine residues might hamper the ability of OPA 1 to favour mitochondrial fusion.

This hypothesis was validated by identifying which residues of cysteine were involved in the formation of disulfides cross-bridges.

Since NMR and crystallographic structure of OPA 1 is not available, 3D structure information were obtained by means of homology modeling. In a collaborative effort with Prof. S. Moro (Faculty of Pharmacy, University of Study of Padova), analyses were carried out aimed at identifying the cysteine residues exposed on the protein surface that is also the region involved in OPA 1 dimerization. As a result of this study, cysteines 853, 856 and 874 were indicated as the residues that more likely contribute to the formation of OPA 1 complexes.

This hypothesis was verified by performing site-directed mutagenesis experiments on the expression construct containing wild-type *Opa1* isoform 1. By substituting the native cysteine residues with serine. This approach allowed us obtaining the following mutants: (i) the double mutant in C853-6S; (ii) the single mutants in C853S or in C874S. New clones have been sequenced to ensure fidelity. Lentiviral vectors containing the mutated cysteine plasmids were produced in order to transfect OPA 1^{-/-} MEF cell line (kindly given by Prof. L. Scorrano). Both C853S and C853-6S expressed detectable level of OPA 1, while cells containing OPA 1 mutated in the single residue C874S were not obtained.

Cells harbouring the OPA 1 mutants were assessed for mitochondrial morphology. Under control conditions C853-6S cells displayed punctuate mitochondria that is similar to the mitochondrial phenotype displayed by OPA 1^{-/-} MEF cells; conversely, the expression of the C853S mutant restored the fusion morphology.

Cells were incubated with H₂O₂ in order to elucidate the relationship between OPA 1 aggregation and disulphide crossbridge formation. OPA 1 complex formation was inhibited in both cell lines.

To investigate the correlation between OPA 1 aggregation and mitochondrial fission, C853S cells were treated with H₂O₂. In C853S mutants the time required for completing the fission process was doubled with respect of MEF wild type cells.

In conclusion these findings highlight the relevance of cysteine 853 in maintaining the role of OPA 1 in mitochondrial fusion, and especially in the derangement of this function caused by oxidative stress. In fact, when cells expressing the mutant C853S were exposed to a severe oxidative stress, OPA 1 aggregation was prevented along with a significant delay in the occurrence of mitochondrial fission.

2. INTRODUZIONE

I mitocondri sono organelli subcellulari complessi presenti in tutte le cellule eucariotiche aerobie. Indipendentemente dal tipo di cellula, i mitocondri mantengono una struttura costante data da una membrana mitocondriale esterna (m.m.e.) e da una membrana mitocondriale interna (m.m.i.), che, separate da uno spazio intermembrana, delimitano la camera interna.

La membrana mitocondriale interna possiede una struttura fittamente ripiegata in strutture denominate creste (*cristae*), che separano il lume delle *cristae* (matrice) dallo spazio intermembrana (Gottlieb, 2000) (figura 1).

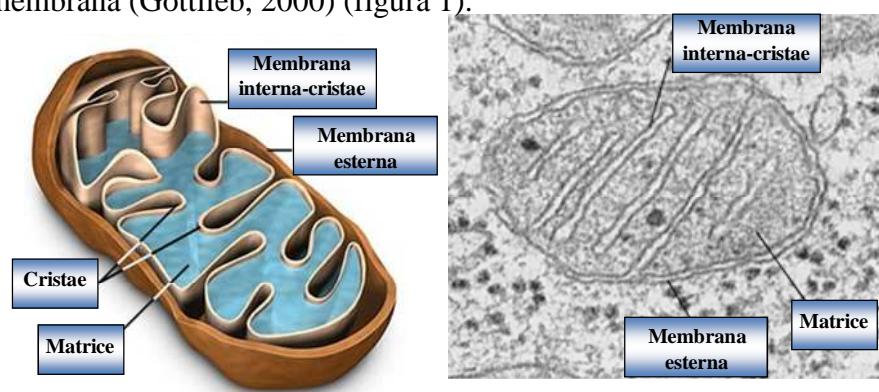


Figura 1. Struttura del mitocondrio e sezione da microscopia elettronica

Nei mitocondri lo spazio intermembrana ha una composizione ionica simile al citoplasma (Rosenberg, 2004). L'integrità delle membrane mitocondriali risulta essenziale per lo svolgimento di processi metabolici mitocondriali quali la β -ossidazione degli acidi grassi, il ciclo degli acidi tricarbossilici, la catena di trasporto degli elettroni e la fosforilazione ossidativa. Nel cuore i mitocondri rappresentano circa il 30% del volume totale delle cellule e sono importantissimi per il rifornimento dell'energia richiesta per la contrazione mediante il processo di fosforilazione ossidativa che consente la trasformazione dell'energia liberata dall'ossidazione dei nutrienti nella sintesi dell'ATP, accoppiando tale processo con il consumo di ossigeno.

Numerose cardiomiopatie sono una diretta conseguenza di deficienze nel metabolismo mitocondriale, in quanto il cuore dei mammiferi è un organo che possiede un metabolismo obbligatoriamente aerobio e risulta pertanto particolarmente suscettibile alle disfunzioni mitocondriali. Il mantenimento di una corretta funzionalità mitocondriale, rappresenta un requisito fondamentale per la sopravvivenza della cellula in quanto la sua completa inibizione provoca morte cellulare.

I mitocondri sono infatti coinvolti in ambedue le modalità di morte cellulare: la necrosi e l'apoptosi. Un fattore chiave della via apoptotica è il citocromo c, collocato nello spazio intermembrana, elettrostaticamente associato alla citocromo c reduttasi, alla citocromo c ossidasi e alla cardiolipina (lipide asimmetricamente distribuito sulla faccia interna della m.m.i). Il rilascio del citocromo c nel citoplasma determina la fase finale dell'apoptosi attraverso l'attivazione di particolari enzimi proteolitici definiti caspasi. Il mantenimento dell'integrità funzionale e strutturale della membrana mitocondriale interna ed esterna è dunque essenziale per impedire la fuoriuscita del citocromo c. La permeabilità della m.m.e. può essere alterata dall'inserimento di proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 in grado di formare pori.

I membri antiapoptotici della famiglia Bcl-2 tendono ad inibire il rilascio delle proteine mitocondriali, rilascio che viene favorito dai membri proapoptotici della famiglia, quali Bid, Bax, Bad (Gross et al., 1999). I principali attivatori della via intrinseca apoptotica sono le proteine della famiglia Bcl-2 ed i fattori di rilascio mitocondriali, quali il citocromo c, l'*apoptosis inducing factor* (AIF) e la proteina smac/DIABLO (figura 2).

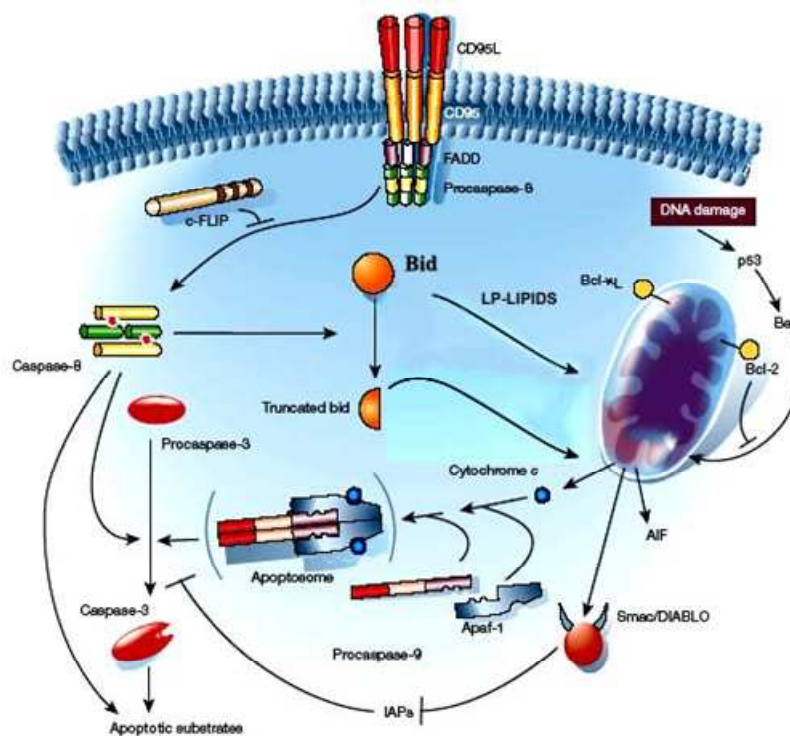


Figura 2. Ruolo dei mitocondri nei processi apoptotici. In seguito all'induzione del processo apoptotico si verificano modificazioni a livello delle membrane mitocondriali. Ciò determina il rilascio di fattori proapoptotici come il citocromo c, AIF e la proteina smac/diabolo. A questi eventi fa seguito l'attivazione delle caspasi che innescano una cascata di eventi proteolitici che portano a morte la cellula.

La permeabilità della m.m.e. sarebbe dunque il risultato dell'equilibrio tra le varie proteine della famiglia Bcl-2 (Di Lisa et al., 2007).

L'inserimento delle proteine formanti pori può spiegare il passaggio di piccole proteine, quali il citocromo c, ma non rende conto della fuoriuscita di proteine più grandi o di complessi di proteine, quali si osservano durante l'apoptosi. A tali fenomeni appare contribuire in modo determinante il poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTP). La sua struttura non è ancora stata identificata ma si ipotizza che esso consista in un canale Ca^{2+} dipendente, voltaggio dipendente e ciclosporina A (CsA) sensibile, del diametro di 3 nm situato a livello della m.m.i. L'apertura del PTP determina profonde alterazioni del metabolismo energetico, quali disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e deplezione dell'ATP, condizioni che rendono difficile la sopravvivenza cellulare. Infatti, l'apertura del PTP viene oggi comunemente ritenuto un evento determinante nella morte cellulare sia per apoptosi, sia per necrosi (Bernardi et al., 2006).

L'apoptosi, unitamente alla necrosi, è un fenomeno che caratterizza il danno cardiaco, primo tra tutti l'ischemia miocardica. L'ischemia è causata da una diminuzione del flusso sanguigno e da un conseguente ridotto apporto di ossigeno. Nelle regioni interessate da ischemia si verificano drastiche modifiche del metabolismo con conseguente accumulo di ioni e metaboliti. Questi processi provocano lo sviluppo di un elevato livello di radicali liberi, denominate "reactive oxygen species" (ROS). Un importante bersaglio delle ROS nel danno ischemico sono i mitocondri che rappresentano anche il principale sito di produzione di queste molecole all'interno della cellula. L'inibizione della catena respiratoria mitocondriale favorisce infatti la formazione delle ROS. Un'ulteriore fonte delle ROS sono le monoaminossidasi (MAO), enzimi localizzati a livello della m.m.e. che catalizzando l'ossidazione delle ammine biogene hanno come prodotto di reazione fisiologico il perossido di idrogeno (H_2O_2). Le ROS, ed in particolare il radicale idrossile, sono dannosi per la loro capacità di interagire con moltissime macromolecole come lipidi, DNA e proteine.

2.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

In ambiente aerobio le cellule generano energia principalmente a livello mitocondriale, attraverso la riduzione della molecola di ossigeno ad acqua nella catena respiratoria. La reazione di trasferimento degli elettroni avviene attraverso passaggi progressivi e controllati tuttavia, prevalentemente a livello del complesso III, (Chandel et al., 2000) possono originarsi ed essere rilasciati intermedi parzialmente ridotti dell'ossigeno: *radicale anionico superossido* ($\text{O}_2^{\bullet -}$), *acqua ossigenata* (H_2O_2) e *radicale idrossile* (OH^{\bullet}). Queste tre specie, insieme a intermedi instabili derivanti dalla perossidazione lipidica, vengono definiti specie reattive dell'ossigeno (ROS).

- Il *radicale anionico superossido* è formato dalla reazione dell'ossigeno con un singolo elettrone. La reazione può avvenire spontaneamente in presenza di ioni ferrosi, altri metalli o metaboliti reattivi. Tale molecola si comporta soprattutto da riducente (verso citocromo *c* e ioni metallici).

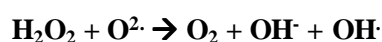
- L'*acqua ossigenata* è prodotta dalla riduzione dei due elettroni dell'ossigeno molecolare. Questa molecola, che permea facilmente le membrane, di per sè è relativamente poco reattiva, tuttavia in presenza di metalli di transizione, Fe^{2+} o Cu^+ , viene convertita in una specie altamente reattiva: il *radicale idrossile*.

- Il *radicale idrossile* è il terzo derivato tossico dell'ossigeno ed è il più reattivo e dannoso perchè non vi sono enzimi in grado di ridurlo. Esso si può formare dalla reazione dell'acqua ossigenata con Fe^{2+} nella reazione di Fenton (Stadtman et al., 1991) (Beckman et al., 1996) (figura 3A): nei sistemi biologici la disponibilità di ioni ferrosi limita la velocità di questa reazione, ma la rigenerazione del Fe^{2+} dal Fe^{3+} per opera di agenti riducenti ne consente il proseguimento.

A Reazione di Fenton



B Reazione di Haber-Weiss



C Reazione del perossinitrito

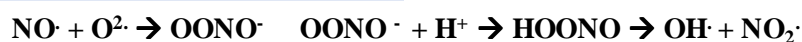


Figura 3. Generazione del radicale libero idrossile. A. La produzione del radicale libero idrossile che coinvolge ferro ferrico ed il ferroso è detta reazione di Fenton. B. La produzione del radicale libero idrossile che coinvolge il radicale anionico superossido e l'acqua ossigenata viene detta reazione di Haber-Weiss. C. La produzione del radicale libero idrossile attraverso una via ferro-indipendente coinvolge l'ossido nitrico, il radicale anionico superossido ed il perossinitrito che si forma nel corso della reazione.

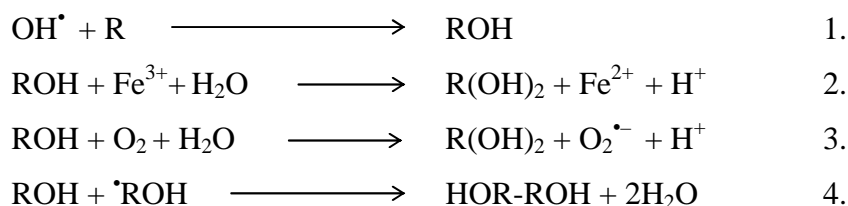
Il radicale idrossile può derivare, ancora, per reazione del superossido con l'acqua ossigenata nella reazione di Haber-Weiss (figura 3B), oppure da radiolisi dell'acqua prodotta da radiazioni elettromagnetiche ad alta energia. Inoltre può formarsi dalla reazione in cui sono coinvolti il radicale anionico superossido e l'ossido nitrico (Beckman, 1996): si tratta di un percorso Fe^{2+} -indipendente che, attraverso la produzione intermedia di perossinitrito, genera il radicale idrossile e un radicale dell'azoto (figura 3C). Anche il perossinitrito ha una forte azione ossidante che ne determina la reattività verso i substrati biologici.

2.2 Meccanismo di danno da ROS

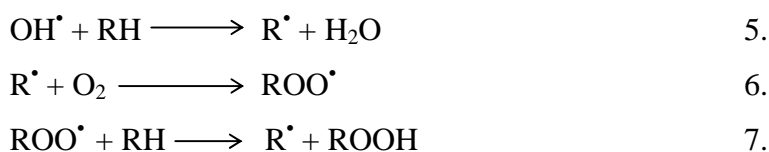
Le specie reattive dell'ossigeno, in particolare il radicale idrossile, possono reagire con tutte le macromolecole biologiche (lipidi, proteine, acidi nucleici e carboidrati), ossidandole. Queste modificazioni ossidative sono implicate nell'innescare o nella progressione di vari stati fisiopatologici. La reazione iniziale può generare un secondo radicale che reagirà con una seconda macromolecola, innescando una reazione a catena. La via ossidativa può procedere attraverso due possibili reazioni:

- addizione di un OH[•] alla molecola organica;
- estrazione di un H[•] dalla molecola organica.

Nella reazione di addizione il radicale ossidrilico si attacca ad un substrato formando un prodotto idrossilato radicalico (reazione 1). Questo potrà essere ulteriormente ossidato da ioni ferro³⁺ (reazione 2), ossigeno (reazione 3) o altri agenti, in una forma più stabile, oppure potrà dismutare (reazione 4) generando dimeri.



Nella reazione di estrazione il radicale idrossile ossida un substrato (reazione 5) formando acqua e un radicale organico (più stabile del radicale idrossile): questo potrà reagire con una molecola di ossigeno (reazione 6) formando un radicale perossidico che rapidamente estrarrà un idrogeno da un'altra molecola (reazione 7) portando alla formazione di un secondo radicale e così via in una reazione a catena.



2.3 Stress ossidativo

Le specie reattive dell'ossigeno sono state a lungo considerate sottoprodotti tossici e indesiderati del metabolismo aerobio da cui la cellula si difende adottando i sistemi di difesa antiossidante enzimatici (quali catalasi, glutazione perossidasi/reduccasi e superossido dismutasi) e non enzimatici (vit. E, vit. C, glutazione e acido urico). Prima di addentrarci in considerazioni inerenti al danno da stress ossidativo, è opportuno tener presente che recentemente le ROS hanno assunto anche un ruolo fisiologico come secondi messaggeri intracellulari (Finkel, 1998).

Ad esempio la produzione di ROS da parte delle cellule fagocitarie costituisce un meccanismo di difesa essenziale dagli agenti infettivi; analogamente le ROS prodotte per stimolazione dei fattori di crescita sono coinvolte nella proliferazione cellulare (Finkel, 2000). Pertanto gli stati fisiopatologici legati al danno da ROS non derivano tanto dalla generazione di radicali, quanto da uno squilibrio, per fattori genetici, alimentari o ambientali, tra produzione di forme radicaliche e funzionalità dei sistemi di difesa: tale condizione è definita con il termine di "stress ossidativo".

Il meccanismo con cui le ROS danneggiano le membrane lipidiche è stato ben caratterizzato e di conseguenza il danno ossidativo è stato spesso esclusivamente associato alla reazione di perossidazione dei lipidi di membrana (Esterbauer et al., 1991). In realtà le ROS sono in grado anche di degradare proteine e acidi nucleici, con conseguenze anche letali. Per quanto riguarda le proteine, le ROS possono portare all'ossidazione del loro scheletro provocandone la frammentazione, oppure all'ossidazione degli aminoacidi che le costituiscono, o ancora alla formazione di legami crociati proteina-proteina. Mentre il danno ossidativo agli acidi nucleici può essere riparato con altissima efficienza attraverso meccanismi di delezione e inserzione, la riparazione del danno alle proteine appare limitata alla riduzione enzimatica degli aminoacidi ossidati contenenti zolfo: infatti solo la cisteina e la metionina sono soggette a ossidazione reversibile. La riparazione di altri tipi di ossidazione delle proteine non è stata dimostrata: la proteina danneggiata diventa dunque il bersaglio dell'azione di varie proteasi endogene come catepsina c, calpaina, tripsina e specialmente del proteasoma (Grune et al., 1995; Grune et al., 1996).

2.4 Danno ossidativo alle proteine

I principi base che regolano l'ossidazione delle proteine da ROS sono stati stabiliti in studi pionieristici da Garrison e Collaboratori, (Rodgers et al., 1968) (Peterson et al., 1969) attraverso l'esposizione delle proteine alle radiazioni ionizzanti: sono stati così caratterizzati i prodotti di reazione in presenza di OH^\bullet , di $\text{O}_2^{\bullet-}$ e della sua forma protonata che si formava nel corso della reazione (HO_2^\bullet), o di una miscela dei tre.

Tuttavia è improbabile che la radiolisi sia la maggior fonte di ROS "in vivo", eccetto in condizioni estreme come l'esposizione ad alte dosi di raggi x o ad alti livelli di radioattività. Ad esempio, in condizioni di ischemia seguita da riperfusione oppure in situazione di stress infiammatorio si evidenziano danni tissutali mediati da un largo incremento di radicali (Oliver et al., 1990).

Questa alta capacità cellulare a generare radicali liberi non mediata da radiolisi mette in luce l'importanza di altri sistemi pro-ossidanti, come illustrato in figura 4.

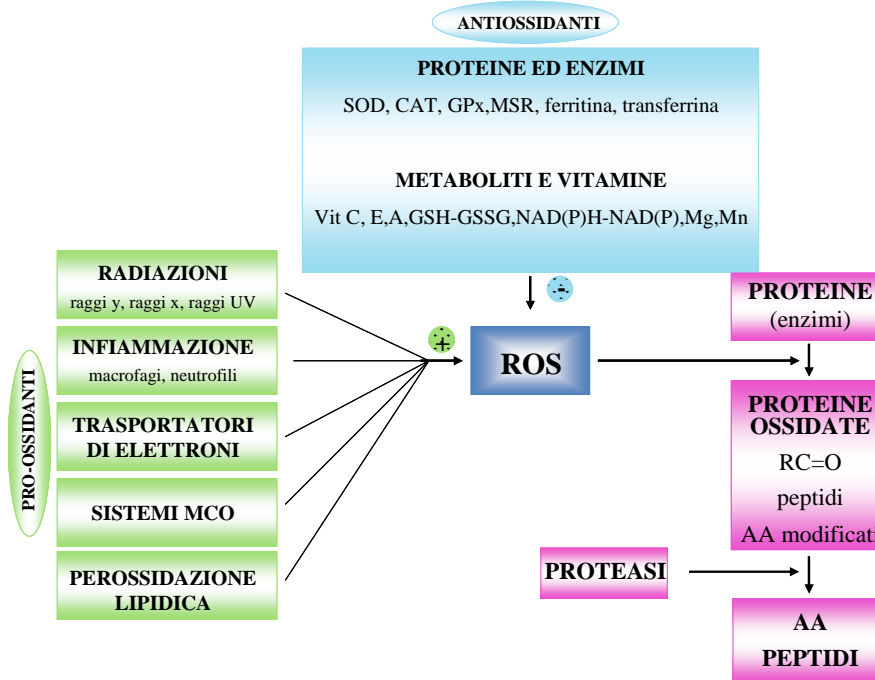


Figura 4. Fattori legati alla produzione di ROS e modificazioni ossidative nelle proteine. SOD: superossido dismutasi; CAT: catalasi; GPx: glutatione perossidasi; MSR: metionina solfoossido reductasi.

Fra tutti, il sistema di ossidazione metallo-catalizzata (MCO), che incontriamo ad esempio nella reazione di Fenton, è la più importante fonte di danno ossidativo (Stadtman et al., 2000). In presenza di Fe^{3+} o di Cu^{2+} , O_2 e di un donatore di elettroni, vari sistemi di ossidazione metallo-catalizzati (MCO) sono in grado di ossidare i residui amminoacidici delle proteine.

2.5 Ossidazione dello scheletro proteico

Come illustrato in figura 5, l'attacco ossidativo alla struttura proteica ha inizio attraverso l'estrazione, da parte di OH^\bullet , di un atomo di idrogeno da un residuo amminoacidico sul carbonio in α (reazione c): ciò porta alla formazione di un carbonio radicalico.

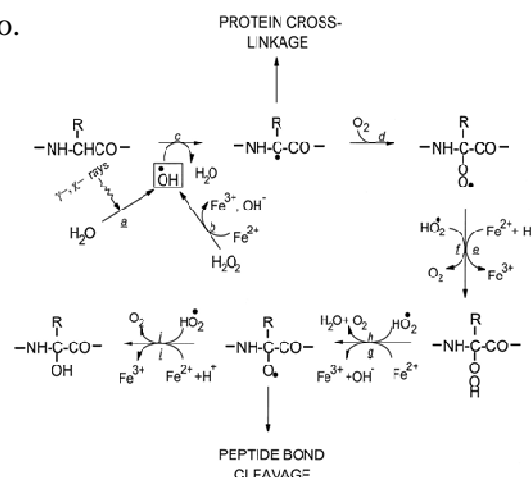


Figura 5. Ossidazione delle proteine mediata da specie radicaliche.

Il radicale idrossile necessario a tale reazione può essere ottenuto dalla radiolisi dell'acqua (reazione a) ma anche dalla riduzione metallo-catalizzata dell'acqua ossigenata (reazione b). Il radicale alchilico così formato reagisce rapidamente con l'ossigeno per formare il radicale alchil perossidico (reazione d); questo può originare un alchilidroperossido (reazione f) seguito dalla formazione di un radicale alcossile (reazione h) che può essere convertito ad ossidrilile (reazione j).

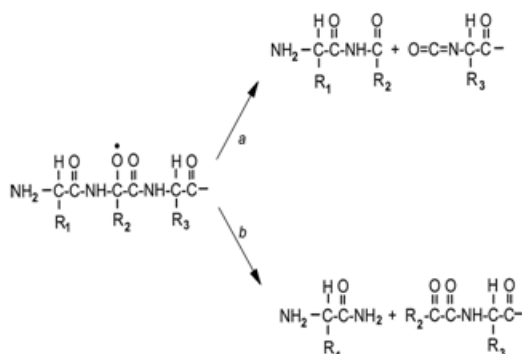
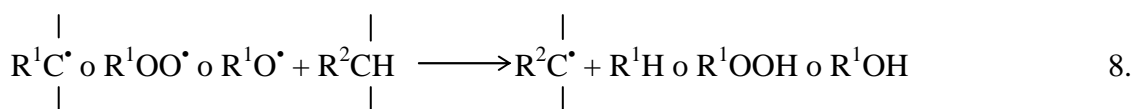


Figura 6. Frammentazione proteica attraverso (A) il percorso della diamide e (B) della α -amidazione.

E' da notare che i passaggi di questo percorso mediati dall'interazione con il radicale idroperossido possono essere catalizzati anche da ioni Fe^{2+} (reazioni e, g e i) o da ioni Cu^+ (non mostrato).

Il radicale alchilico, alchilperossidico e alcossilico possono anche reagire con altri residui aminoacidici della stessa o di un'altra molecola proteica per generare un nuovo carbonio radicale (reazione 8) in grado di subire reazioni simili a quella illustrata in figura 5.



Gli effetti della radiolisi sulle proteine in condizioni anaerobiche sono significativamente differenti da quelli che si osservano in condizioni aerobiche: in assenza di ossigeno il radicale alchilico che si genera all'inizio del percorso ossidativo reagirà con un altro radicale alchilico per formare un legame crociato proteina-proteina (reazione 9). Al contrario, in presenza di ossigeno, si assiste ad una considerevole frammentazione della catena polipeptidica.

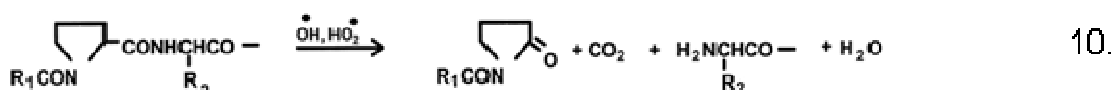


2.6 Frammentazione proteica

La generazione del radicale alcossile rappresenta la tappa fondamentale per la rottura dei legami peptidici che può avvenire attraverso due vie (figura 6): il percorso che porta alla formazione di una diamide (reazione *a*) o quello che porta all' α -amidazione (reazione *b*).

La via della α -amidazione genera un frammento, nella porzione C-terminale della proteina, contenente un gruppo N- α -chetoacile: in seguito ad idrolisi acida (reazione non mostrata) tale frammento peptidico libera un acido α -chetocarbossilico che, per la presenza del gruppo carbonilico, può essere quantificato attraverso la reazione con 2,4-dinitrofenilidrazina. Tuttavia la formazione di gruppi carbonilici dopo esposizione a sistemi che generano ROS non può essere usato come evidenza di frammentazione di proteine perché anche l'ossidazione di alcuni residui aminoacidici può portare alla formazione di gruppi carbonilici.

Il residuo di prolina è il bersaglio preferito nelle scissioni: la possibilità che la rottura del legame peptidico potesse risultare dall'ossidazione della prolina è stato verificato utilizzando sistemi di ossidazione metallo-catalizzate (reazione 10).



2.6.1 Ossidazione della catena laterale degli aminoacidi

Tutti i residui aminoacidici delle proteine sono suscettibili all'ossidazione da ROS. Tuttavia i prodotti formati dall'ossidazione di alcuni aminoacidi non sono stati pienamente caratterizzati. La Tabella I elenca alcuni dei prodotti che si formano durante l'ossidazione dei residui che sono più sensibili all'ossidazione.

2.6.2 Ossidazione di residui aminoacidici contenenti zolfo

I residui di cisteina e di metionina sono particolarmente sensibili all'ossidazione da parte di quasi tutte le forme di ROS. In condizioni non estreme i gruppi tiolici dei residui di cisteina sono convertiti a disolfuri e i residui di metionina in metionina solfossido. La maggior parte dei sistemi biologici può riconvertire i disolfuri delle cistine e i solfossidi della metionina ossidata nelle loro forme originarie. Questo rappresenta l'unico tipo di modificazione proteica ossidativa reversibile (Berlett et al., 1997; Vogt, 1995).

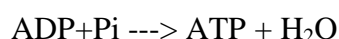
2.7 La catena respiratoria mitocondriale e la produzione di specie reattive dell'ossigeno

Le ROS sono generate in molteplici compartimenti e da diversi enzimi all'interno della cellula, tuttavia la maggiore produzione (circa il 90%) può essere ricondotta ai mitocondri. Questo è una conseguenza diretta del trasferimento di elettroni lungo la catena respiratoria. In tale processo gli elettroni forniti dall'ossidazione dei coenzimi ridotti quali il NADH e il FADH₂ a loro volta generati dal ciclo di Krebs, vengono trasferiti all'ossigeno molecolare portando alla sua riduzione ad acqua.

Gli elettroni prima di essere assunti dall'ossigeno scorrono lungo una catena di trasportatori redox ordinati secondo un potenziale decrescente e integrati nella m.m.i. I trasportatori infatti operando vettorialmente assumono protoni dal lato della matrice, nel momento in cui acquistano elettroni dal trasportatore a monte, per scaricarli all'esterno quando cedono elettroni al trasportatore a valle. Data la bassissima permeabilità passiva della m.m.i. a ioni, a soluti e in particolare ai protoni, la traslocazione dei protoni porta all'instaurarsi di un gradiente elettrochimico tra le due facce della membrana interna dei mitocondri costituito da una componente chimica e da una elettrica:

$$\Delta\mu_H = zF\Delta\Psi + RT\ln([H^+]_i/[H^+]_o)$$

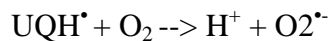
Si stima che il valore di questo gradiente si aggiri intorno ai -220mV e che in condizioni fisiologiche in maggior parte sia rappresentato dalla sua componente elettrica ($\Delta\Psi$) per un valore di -180 mV. L'energia potenziale viene quindi utilizzata per la fosforilazione dell'ADP tramite la F₁F₀ ATPasi in una reazione reversibile definita *fosforilazione ossidativa*.



Un'aumentata concentrazione di ossigeno cellulare o un elevato potenziale di membrana stimolano una maggiore produzione di ROS. La percentuale fisiologica della produzione mitocondriale di specie reattive dell'ossigeno associata con la catena respiratoria dipende in realtà dallo stato metabolico mitocondriale: lo stato 4, o respirazione basale, caratterizzato da un tasso relativamente basso di respirazione e una bassa disponibilità di ADP, è associato a un'alta produzione di ROS. Al contrario lo stato 3, o respirazione ADP stimolata, caratterizzato da un alto consumo di ossigeno e ampia disponibilità di ADP, mostra un basso livello di produzione di ROS, dovuto al maggior stato ossidato dei componenti della catena respiratoria (Boveris et al., 1972) (Cadenas et al., 2000).

I due maggiori siti di generazione di specie reattive dell'ossigeno sono identificabili con il sito I, che le rilascia nel lato matrice, e III, che le rilascia nello spazio intermembrana, dove si verificano le più importanti variazioni di energia potenziale.

Sia il flavin mononucleotide (FMN) che gli otto centri “solfo-ferro” presenti nel sito I sarebbero direttamente coinvolti in tale processo (Liu et al., 1996). Proprio la produzione di ROS a questo livello sembra essere importante nell'insorgenza di diverse patologie come il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer. A livello del sito III invece, il ciclo del coenzima Q contribuisce alla produzione di $O_2^{\circ-}$ (St-Pierre et al., 2002; Turrens et al., 1985; Turrens, 2003), in quanto le forme chinonica e semichinonica dell'ubichinone possono fungere da riducenti monovalenti dell'ossigeno molecolare secondo le reazioni:



Va tuttavia sottolineato come il CoQ nella sua forma completamente ridotta possa esercitare una funzione antiossidante accettando un elettrone dall'anione superossido (Beyer, 1990). Per quanto riguarda la citocromo ossidasi si è visto che la sua inibizione aumenta il danno ossidativo del miocardio. Tale incremento non è causato direttamente dal complesso IV, ma da una riduzione dei centri redox nei complessi I o III con il conseguente aumento della fuga di elettroni e della produzione di ROS (Chen et al., 2003).

2.8 I mitocondri come bersaglio di ROS

Sebbene i mitocondri siano una delle maggiori fonti di ROS sono allo stesso tempo anche estremamente suscettibili ad un loro attacco in primo luogo perchè le membrane mitocondriali sono ricche di acidi grassi poliinsaturi che possono andare incontro a perossidazione lipidica di cui le ROS sono potenti iniziatori. In particolare il doppio strato fosfolipidico mitocondriale dove è localizzata la catena respiratoria è molto ricco di acidi grassi poliinsaturi e quindi la lipoperossidazione può facilmente inibire la trasduzione di energia e modificare il potenziale di membrana mitocondriale. In secondo luogo la membrana interna contiene numerosi enzimi e cofattori facilmente ossidabili. Tatsumi e Kako nel 1993 dimostrano come l'attività della NADH-CoQ reduttasi e dell'ATP sintetasi siano inibite, rispettivamente del 77% e 67% rispetto al controllo, in seguito ad un'esposizione a 10 μ M di H_2O_2 . Si aggiunge una notevole vulnerabilità del DNA mitocondriale in virtù anche della sua localizzazione in prossimità della membrana mitocondriale interna, sito principale per la produzione delle ROS.

2.9 La morfologia dei mitocondri

I mitocondri sono costituiti da una membrana esterna e da una membrana interna, separate da uno spazio intermembrana. La membrana interna mitocondriale è altamente specializzata e, come precedentemente riportato, contiene la catena di trasporto degli elettroni, dove avvengono i processi di fosforilazione ossidativa e di sintesi di ATP.

La m.m.i. è caratterizzata dalla presenza di creste che possiedono dei siti di contatto (CS) (figura 7). Queste *cristae* ripiegandosi formano sub-compartimenti che contengono fattori solubili quali il citocromo c ed AIF, rilasciati in seguito al dispiegamento delle *cristae*. Le *cristae* hanno una struttura tubulare richiusa da una giunzione (tubular junctions) di circa 18 nm di diametro che separa il compartimento interno delle *cristae* dalla matrice mitocondriale (Scorrano et al., 2002). La membrana mitocondriale esterna interagisce mediante l'interfaccia con il citoplasma e con gli elementi citoscheletrici importanti per il movimento dei mitocondri all'interno della cellula.

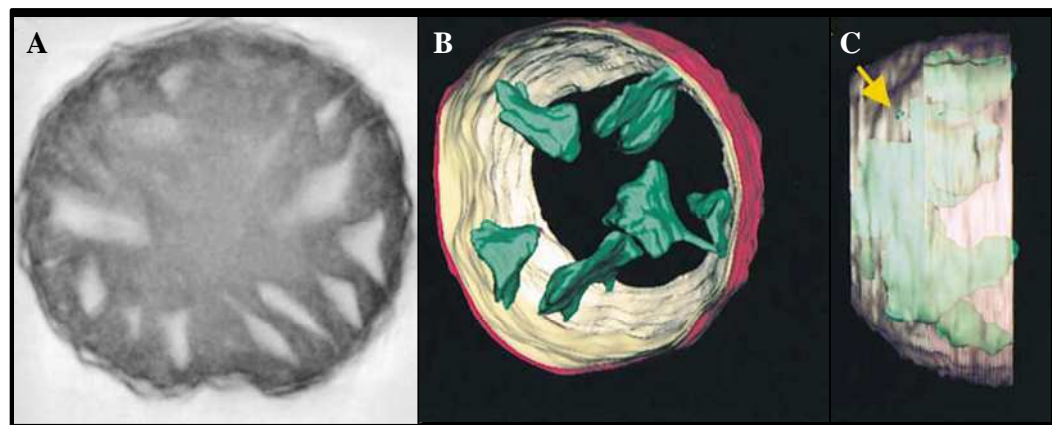


Figura 7. Ricostruzione 3-D, mediante tomografia elettronica, della struttura interna di un mitocondrio. A. Tomogramma in microscopia elettronica di una sezione mitocondriale B. Ricostruzione tomografica in 3D: in rosa è rappresentata la m.m.e., in bianco la m.m.i. ed in verde la struttura delle *cristae*. C. La freccia indica una "*cristae junction*".

Questa mobilità è essenziale per la distribuzione dei mitocondri durante la divisione cellulare, differenziazione e per posizionare i mitocondri in regioni cellulari ad intensa domanda energetica. I mitocondri scivolano lungo i filamenti d'actina usando chinesine e dineine dipendenti dall'idrolisi d'ATP. La morfologia dei mitocondri è invece il risultato dei processi di fusione e fissione, controllati da una serie di proteine i cui livelli e funzioni sembrano influenzare le vie mitocondriali di morte cellulare.

2.10 Fusione e fissione mitocondriale

Con il termine di fissione mitocondriale si intende la rottura della rete mitocondriale in piccoli organelli isolati. È un tipico processo che si manifesta nelle cellule in divisione al fine di assicurare l'ereditarietà del patrimonio mitocondriale. Tale processo avviene inoltre durante la differenziazione, in risposta a variazioni del fabbisogno energetico della cellula o all'esposizione a tossine (Yaffe, 1999b)

La fissione mitocondriale viene finemente bilanciata mediante il processo di fusione mitocondriale (figura 8). La fusione ha la funzione di mantenere i mitocondri interconnessi in modo da ottimizzarne funzionalità quali il trasferimento del potenziale di membrana mitocondriale da regioni ricche in ossigeno a regioni anossiche della cellula (Skulachev, 2001). L'eccessiva fissione mitocondriale, dovuta ad assenza di eventi di fusione, provoca rottura della rete mitocondriale, perdita del DNA mitocondriale (mtDNA), perdita della funzionalità respiratoria ed aumento nella produzione delle ROS (Yaffe, 1999a).

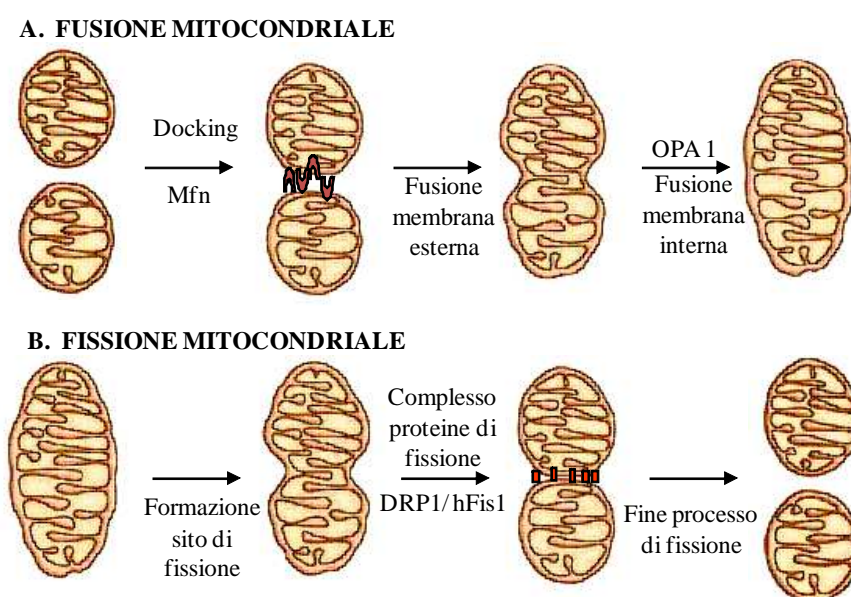


Figura 8. Rappresentazione dei processi di fissione e fusione mitocondriali. I processi di fusione (A) e fissione (B) mitocondriali avvengono sia a livello della membrana mitocondriale interna che della membrana mitocondriale esterna. Si ipotizza che le proteine o i complessi proteici coinvolti nei due processi siano diversi.

I meccanismi di fusione e fissione riguardanti la m.m.e. sono stati ben caratterizzati, mentre si conosce poco riguardo a tali processi a livello della m.m.i. La morfologia mitocondriale è quindi complessa, dinamica e continuamente rimodellata dagli eventi di fusione e fissione che sono coordinati per rispondere a specifiche esigenze cellulari.

2.11 Fusione e fissione nell'apoptosi

I processi di fusione e fissione mitocondriali sono strettamente connessi ad eventi importanti dell'apoptosi. Infatti nella maggior parte delle tipologie cellulari i mitocondri sono organizzati all'interno di una rete di organelli, ma già all'inizio del processo apoptotico tale rete tende a frammentarsi (Frank et al., 2001). Questi cambiamenti morfologici mitocondriali sembrano essere rilevanti per il rilascio del citocromo c e di altre proteine proapoptotiche che una volta nel citosol stimolano l'attivazione delle caspasi (Cereghetti et al., 2006). Questo rilascio è controllato dalle proteine della famiglia delle Bcl-2, che comprende proteine anti- e proapoptotiche (Danial et al., 2004).

Non è chiaro come fisicamente interagiscano le proteine coinvolte nel rimodellamento mitocondriale con le Bcl-2, ma studi di sovraespressione dimostrano che le mitofusine interagiscono con Bax e Bak, due proteine proapoptotiche appartenenti alla famiglia Bcl-2 (Neuspiel et al., 2005; Sugioka et al., 2004). Recenti studi nell'ambito delle membrane mitocondriali hanno portato a considerare la relazione tra i processi di fusione e fissione mitocondriale ed il poro di transizione della membrana mitocondriale (PTP). L'apertura del PTP determina una profonda alterazione del metabolismo energetico in quanto in seguito provoca la depolarizzazione della membrana mitocondriale ed una deplezione nei livelli di produzione di ATP. Si verifica inoltre un processo definito *swelling* (rigonfiamento) della matrice: con l'apertura del PTP si verifica l'ingresso di soluti e di acqua nella matrice mitocondriale; il rigonfiamento di questo spazio determina un'espansione della m.m.i., la quale, avendo una superficie maggiore alla m.m.e., non può più essere contenuta da questa determinandone la rottura. L'apertura del PTP viene oggi comunemente ritenuto un evento determinante nella morte cellulare sia per apoptosi, sia per necrosi (Bernardi et al., 2006). La riorganizzazione delle creste a livello della m.m.i permette il rilascio di componenti a basso peso molecolare quali citocromo c ed AIF (apoptotic inducing factor), tra i maggiori attivatori della via di morte cellulare (Susin et al., 1996).

Il citocromo c è una proteina fondamentale per la catena di trasporto degli elettroni ed è localizzata normalmente nello spazio intermembrana dei mitocondri. La maggior parte della proteina è sequestrata tra le *cristae* ed il suo rilascio è subordinato al loro rimodellamento (Scorrano et al., 2003; Scorrano et al., 2002). Il meccanismo molecolare alla base di tale rilascio non è ben conosciuto, ma è associato al rigonfiamento della matrice (Mannella,2006a;Mannella,2006b;Scorrano et al.,2002). Le proteine della famiglia Bcl-2 hanno mostrato interazioni con le proteine che formano il poro e che regolano il rilascio del citocromo c e di altri fattori proapoptotici come AIF (Lorenzo et al., 1999).

I neuroni cui manca AIF presentano frammentazione dei mitocondri e mancanza di creste che suggerisce un ruolo di queste nel controllo della struttura dei mitocondri (Cheung et al., 2006). Le proteine della famiglia Bcl-2 inoltre co-localizzano con numerose proteine di fusione e recenti evidenze indicano che i fattori che promuovono la fusione sono anti-apoptotici, mentre quelli che promuovono la fissione sono pro-apoptotici (Delivani et al., 2006; Estaquier et al., 2006).

2.12 Proteine regolatrici della morfologia mitocondriale

Fusione e fissione mitocondriali sono controllati da GTPasi appartenenti alla famiglia delle dinamine. Le dinamine SONO meccanoenzimi ubiquitari e di grandi dimensioni che utilizzano l'energia libera generata dall'idrolisi del GTP per esercitare forze meccaniche sulle membrane cellulari. Tali enzimi sono inoltre responsabili della tubulazione e della vescicolazione delle membrane cellulari (McNiven et al., 2000).

Negli eucarioti superiori OPA 1 e mitofusine (Mfn1 e Mfn2) regolano la fusione, mentre il meccanismo di fissione mitocondriale è controllato da Drp1 (dynamamin related protein) (Smirnova et al., 2001) e da hFis1 (mitochondrial fission 1 protein homologue).

Drp1 è costituita da un dominio centrale tipico delle dinamine, un dominio effettore GTPasico (GED) al C-terminale e dal dominio GTPasico al terminale amminico della proteina. È stato proposto che l'attività GTPasica sia accoppiata al meccanismo di curvatura della membrana mitocondriale e di fissione (Smirnova et al., 2001). Un'altra ipotesi riguardante Drp1 è che tale proteina utilizzi l'idrolisi del GTP come meccanismo regolatorio per l'attivazione di altre molecole non ancora identificate. Drp1 risiede normalmente a livello citoplasmatico ed è priva di sequenze di ancoraggio mitocondriale. Tale proteina viene reclutata sul lato citoplasmatico della m.m.e. attraverso il legame con hFis1, una piccola proteina contenente un'elica transmembrana al C-terminale (Dimmer et al., 2006). Sembra che hFis1 svolga il ruolo di adattatore nella formazione di complessi oligomerici ad alto peso molecolare di Drp1. La traslocazione di Drp1 è mediata da vari stimoli, quale ad esempio la defosforilazione del residuo Ser637 da parte dell'enzima calcineurina (Cereghetti et al., 2008). Secondo un recente modello, Drp1 si associa in anelli o spirali intorno al tubulo mitocondriale, dove si racchiude strettamente inducendone la frammentazione (Hoppins et al., 2008).

Il meccanismo alla base del processo di fissione della m.m.i. non è ancora stato caratterizzato, ma potrebbe coinvolgere altre proteine quali MDM33 nel lievito (Messerschmitt et al., 2003) e MTP18 nell'uomo (Tondera et al., 2005).

Nonostante sia ipotizzabile un meccanismo di coordinazione tra attivazione di fusione e fissione mitocondriali, il processo di fusione si avvale di un distinto gruppo di molecole effettrici.

Le mitofusine 1 (Mfn-1) e 2 (Mfn-2) risiedono ambedue a livello della membrana esterna mitocondriale ed hanno un'omologia di sequenza dell'81%. Possiedono una regione ad attività GTPasica all' N-terminale seguita da una regione a struttura coiled coil. Sono ancorate alla membrana mediante una regione a U transmembrana che termina verso il citosol con una regione ad α -elica al C-terminale (regione HR2). Mfn-1 e 2 possono oligomerizzare o eterodimerizzare. Da studi condotti in cellule ibride derivanti da linee *wild-type* e non esprimenti Mfn sembra che il ruolo degli oligomeri sia quello di posizionare ed avvicinare i mitocondri mediante il legame delle regioni HR2 durante la fusione (Koshiba et al., 2004). Le mitofusine promuovono il processo di fusione mitocondriale. In particolare, soltanto Mfn-1 promuove tale processo in presenza di OPA 1 (Cipolat et al., 2004). Una nuova funzione relativa a Mfn-2 riguarda il suo coinvolgimento nella giustapposizione tra reticolo endoplasmatico e mitocondri (De Brito et Scorrano, 2008). Anche OPA 1, proteina oggetto del nostro studio, appartiene alla famiglia delle proteine dinamina-simili.

2.13 OPA 1

OPA 1 è una GTPasi di 120 kDa localizzata nella m.m.i. e nello spazio intermembrana (Olichon et al., 2003). *Opa 1* è stata identificata come il gene mutato nell'atrofia ottica dominante ereditaria (ADOA) conosciuta anche come malattia di Kjer di tipo I, che colpisce maggiormente le cellule gangliari della retina e causa progressiva cecità dovuta alla perdita di queste cellule (Amati-Bonneau et al., 2009). OPA1 è mutata nel 90% dei casi di atrofia ottica dominante e la maggior parte dei pazienti presenta mutazioni del dominio GTPasico, della regione coiled coil della proteina. Il 50% delle mutazioni identificate portano alla generazione di una proteina tronca e ciò fa ipotizzare che l'aploinsufficienza sia la causa della malattia (Ferre et al., 2005). Inoltre l'alta frequenza di mutazioni non senso negli ultimi tre esoni porta alla formazione di proteine tronche in grado di agire da dominanti negativi.

Il gene che codifica per *Opa 1* è composto da 30 esoni che, mediante splicing alternativo degli esoni 4, 4b e 5b, determinano l'espressione di almeno 8 isoforme di mRNA con modalità tessuto specifica nell'uomo (Delettre et al., 2002) (figura 10) e di 4 isoforme nel topo (Akepati et al., 2008).

La proteina tradotta contiene delle sequenze di indirizzamento alla matrice mitocondriale (mitochondrial targeting sequences, MTS) che precedono il dominio transmembrana della proteina e che sono necessarie per il passaggio della proteina, codificata a livello nucleare, in matrice.

Le sequenze MTS vengono clivate nella matrice ad opera di peptidasi mitocondriali e le risultanti isoforme lunghe della proteina rimangono ancorate alla m.m.i.

La proteina è costituita da cinque domini principali: la sequenza di indirizzamento MTS, una regione transmembrana (HD), il dominio GTPasico, la regione centrale ed un dominio coiled coil al C-terminale (figura 9).

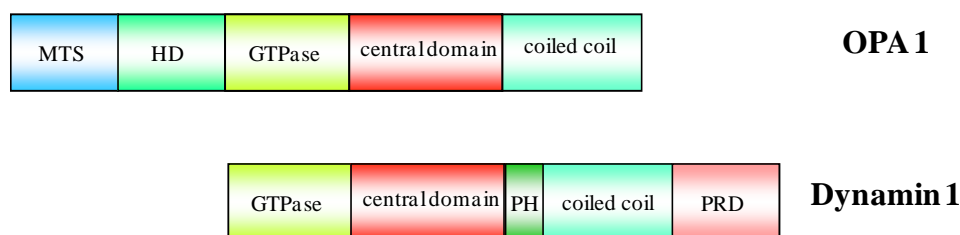


Figura 9: Schema della struttura della proteina OPA 1 confrontata con la proteina Dynamin 1. La struttura di OPA 1 si differenzia dalle dinamine per la presenza di una porzione N-terminale per l'indirizzamento mitocondriale (MTS) e di una porzione idrofobica per l'ancoraggio alla m.m.i. (HD). Inoltre le dinamine possiedono il sito di omologia per la plecstrina (PH) necessario per il legame con le membrane.

La regione centrale della dinamina ricopre un ruolo di regolazione dell'attività GTPasica e i domini coiled coil sono implicati nelle interazioni con altre proteine.

Le diverse isoforme hanno un pattern di espressione variabile nei differenti tessuti e cellule. In particolare nel cuore predominano le isoforme contenenti l'esone 4 (Olichon et al., 2007). In vivo si ha il clivaggio a livello dei siti S1 ed S2 delle isoforme lunghe di OPA1, generando così più isoforme corte con diverse funzioni. Sono state identificate diverse proteasi coinvolte nel processamento di tale proteina. La proteasi YME1L1, appartenente alla famiglia delle AAA-proteasi (ATPase associated with diverse cellular activities) e presente nello spazio intermembrana dei mitocondri, regola il clivaggio al sito S2. A livello del sito S1 risultano invece coinvolte AAA-proteasi di matrice (paraplegina, AFG3L1, AFG3L2) e la proteasi romboide PARL (romboide presenilin-associated rhomboid-like protease). Recentemente è stata scoperta la peptidasi OMA1, che, a livelli della m.m.i., media il processamento di OPA1 quando le AAA-proteasi sono assenti o inattive (Ehse et al., 2009)(figura 10).

Data l'identificazione di diverse isoforme di OPA 1, si ipotizza che la proteina sia bi o multi- funzione e che per questo motivo la sua attività dipenda da quale isoforma predomina (Scorrano et al., 2002).

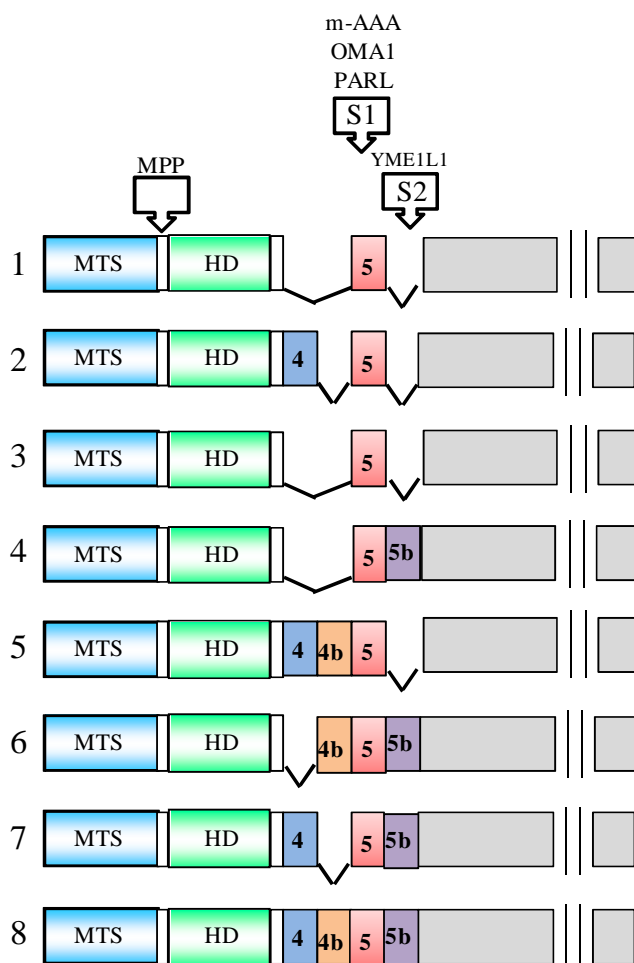


Figura 10: Rappresentazione schematica delle 8 isoforme di mRNA umane di OPA1 con relativi siti di clivaggio (\square) e proteasi coinvolte.

2.13.1 Funzioni della proteina OPA 1

La proteina OPA 1 è coinvolta in molteplici processi cellulari, quali: la fusione della m.m.i., il rimodellamento delle *cristae* mitocondriali ed il processo di apoptosi.

La mancanza della proteina OPA 1 provoca frammentazione della rete mitocondriale. Un recente lavoro ha dimostrato che in una linea cellulare knock-out per OPA 1, il fenotipo viene ripristinato in seguito all'espressione dell'isoforma 1 della proteina (Alexander et al., 2008).

L'espressione di OPA 1 promuove quindi il processo di fusione mitocondriale che avviene grazie al dominio GTPasico e al C-terminale coiled coil.

La necessità del dominio coiled coil suggerisce che le interazioni proteina-proteina siano importanti per la fusione mediata da OPA 1. OPA 1 sembra agire da fattore di fusione mitocondriale interagendo con le proteine di fusione della membrana esterna, ed in particolare con Mfn-1 (Cipolat et al., 2004).

E' stato inoltre identificato il ruolo di OPA1 nel controllo della via mitocondriale di rimodellamento delle *cristae* in corso di apoptosi. Recentemente è stato infatti scoperto che OPA 1 è in grado di ritardare la morte cellulare programmata indipendentemente dal suo effetto fusogeno.

Quest'inibizione dipende dal dominio GTPasico di OPA 1 e si esercita a livello della mobilitazione del citocromo c dalle *cristae* allo spazio intermembrana. Il mantenimento delle giunzioni tubulari strette correla con la formazione di etero-oligomeri con altre proteine coinvolte nel rimodellamento mitocondriale, come ad esempio le mitofusine (Chen et al., 2003), oligomeri che, in corso di apoptosi sono rapidamente destabilizzati (Frezza et al., 2006). Tali oligomeri comprendono una forma solubile di OPA 1, liberata nello spazio intermembrana e generata in seguito al clivaggio delle isoforme lunghe di OPA1 da parte della proteasi PARL (Cipolat et al., 2006). Questi risultati suggeriscono che interferendo con la funzione GTPasica di OPA 1, necessaria per la sua azione antiapoptotica, sia possibile aumentare il rilascio di citocromo c.

Inoltre riguardo al processo di apoptosi, OPA 1 sembra interagire con effettori apoptotici come ad esempio Bid, una proteina della famiglia delle Bcl-2 (Frezza et al., 2006.). Il meccanismo di assemblaggio e disassemblaggio degli oligomeri di OPA 1 rimane ancora incompreso (Yamaguchi and Perkins, 2009). Il coinvolgimento di OPA 1 in tale processo è provato dal fatto che il silenziamento di OPA 1 mediante RNA interfering ha un profondo impatto sulla vitalità delle cellule e causa la frammentazione mitocondriale, la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale, cambiamenti ultrastrutturali e morte cellulare (Chen et al., 2005; Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2003).

3 SCOPO DELLA TESI

OPA 1 rappresenta attualmente l'unica proteina coinvolta nei processi di fusione e fissione mitocondriale localizzata a livello della membrana mitocondriale interna. A livello di tale membrana sono situati i complessi della catena respiratoria mitocondriale, principale sito di produzione delle specie reattive dell'ossigeno durante la ri-perfusione post-ischemica del cuore.

L'obiettivo iniziale di questo studio è stato quello di valutare l'effetto dello stress ossidativo sulla proteina mitocondriale OPA 1 a livello cardiaco.

In particolare, per determinare l'effetto dello stress ossidativo sulla proteina OPA 1 sono stati utilizzati sia cuori isolati da ratto e sottoposti a protocolli di induzione di stress ossidativo (ischemia/ri-perfusione e perfusione con perossido di idrogeno), sia un modello cellulare di cardiomiociti (cellule HL-1) incubati con H_2O_2 . È stato in tal modo valutato se OPA 1 fosse bersaglio delle ROS e quali fossero le modifiche ossidative a carico della proteina.

Successivamente, dato il ruolo della proteina OPA 1 nel processo di fusione mitocondriale, si è voluto chiarire la relazione tra ossidazione di OPA 1 e variazione della dinamica mitocondriale, nei modelli cellulari HL-1 e MEF (mouse embryonic fibroblasts).

Infine, con l'obiettivo di stabilire un nesso di causalità tra le modifiche ossidative a carico di OPA1 e le alterazioni osservate a livello mitocondriale e cellulare, è stata eseguita una mutagenesi sito diretta in residui cisteinici in seguito a predizione mediante homology modelling.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Colture cellulari

Le cellule HL-1 utilizzate negli esperimenti appartengono ad una linea cellulare stabilizzata di miociti cardiaci derivante da cellule tumorali atriali di topo (AT-1).

Tali cellule vengono piastrate alla concentrazione di $0,6 \times 10^5$ /cm² in fiasche di polipropilene (Falcon) pretrattate con $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di fibronectina in gelatina (0,02%) (Sigma Co.), che le ancora alla superficie di supporto. Sono state coltivate in terreno di coltura Claycomb Medium (JRH Biosciences, Inc. Lenexa KS) supplementato, immediatamente prima dell'uso, con L-glutammina 4 mM (Life Technologies), penicillina e streptomina 100 UI/ml (Sigma Co.), 10% FCS (fetal calf serum, Sigma) inattivato al calore (55°C per 30 minuti) e norepinefrina 50 μM . Le cellule vengono mantenute in incubatore a 37°C e in atmosfera di CO₂ al 5%.

È stata utilizzata anche una linea cellulare di fibroblasti murini (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF). Si tratta di cellule aderenti che vengono piastrate alla concentrazione di $0,6 \times 10^5$ /cm² in fiasche di polipropilene (Falcon) e mantenute in coltura utilizzando terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (DMEM, Sigma-Aldrich) supplementato, prima dell'uso, con L-glutammina, 4mM (Life Technologies); penicillina e streptomina 100 UI/ml (Sigma Co.), 10% FCS (fetal calf serum, Sigma) inattivato al calore (55°C per 30 minuti), amminoacidi non essenziali (Sigma) 1X e uridina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma Co.).

Per effettuare gli esperimenti, le cellule HL-1 e MEF sono state prima lavate in PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄) e poi trattate con tripsina (0,05% p/v), in modo da staccarle dal fondo delle fiasche di coltura, e successivamente addizionate con 10 volumi di mezzo di coltura per neutralizzare, tramite diluizione, l'azione della tripsina. La sospensione cellulare ottenuta, con una concentrazione cellulare compresa tra $2,5 \times 10^5$ e 2×10^6 in base al trattamento sperimentale, è stata distribuita in piastre sterili all'interno delle quali era stato precedentemente posto un vetrino copri-oggetto del diametro di 24mm pretrattato con fibronectina/gelatina o, in alternativa, in fiasche sterili. Le cellule sono state lasciate in coltura in incubatore a 37°C per almeno 24 ore prima dell'utilizzo sperimentale.

Per la produzione vettori lentivirali sono state utilizzate cellule Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293), come cellule di packaging. Queste cellule vengono piastrate in petri di 10 cm di diametro e mantenute nello stesso terreno di coltura delle MEF.

4.1.1 Protocollo di congelamento

Le cellule in fase di crescita logaritmica sono state raccolte dopo tripsinizzazione e centrifugate a 250 x g per 5 minuti. Il pellet, costituito dalle cellule, è stato risospeso nel mezzo di congelamento, contenente FCS 95% (4-8°C) e DMSO 5% (agente crioprotettivo). Le cellule sono state aliquotate (1-2 ml) in criovials sterili in una concentrazione di 1×10^7 cell./ml. Il congelamento avviene gradualmente in bagno di alcool isopropilico che consente un abbassamento costante e graduale della temperatura (1°C/min). Una volta congelate le cellule sono state mantenute in azoto liquido.

4.1.2 Protocollo di scongelamento

Le cellule, conservate in azoto liquido, sono state rapidamente scongelate a 37°C per il ripristino della coltura e diluite in 10 ml di terreno di coltura. Dopo centrifugazione per 5 minuti a 250 x g (al fine di eliminare il DMSO), il pellet cellulare è stato risospeso nel terreno di coltura completo. Mediante colorazione con Trypan blue (Sigma-Aldrich) è stato stimato il numero di cellule vive e si è proceduto alla diluizione necessaria per la messa in coltura.

4.1.3 Coating di gelatina/fibronectina

E' stata preventivamente preparata una soluzione di gelatina (Sigma G-1393) in acqua sterile allo 0,02% . Alla soluzione così preparata sono stati aggiunti, in condizioni di sterilità, 25µg/µl di fibronectina bovina (Sigma). La soluzione ottenuta è stata distribuita uniformemente all'interno delle fiasche ($1\text{ml}/25\text{cm}^2$). Le fiasche, ben chiuse, sono state incubate per 12 ore a 37°C e poi trasferite a -20°C. In queste condizioni possono essere conservate per circa 30 giorni. Prima di piastrare le cellule, fiasche e piastre sono state lavate con PBS sterile.

4.2 Protocolli sperimentali per il trattamento delle cellule

4.2.1 Trattamento con H₂O₂ e lisi cellulare

Le cellule sono state piastrate in fiasche da 25 cm² e sono state poste in coltura fino a raggiungere una confluenza dell' 80%. Sono state lavate con 2 ml di tampone PBS e incubate per 30 minuti a 37°C con una soluzione di HBS-sodio (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, pH 7.4) (controllo) o HBS-sodio addizionato con 1mM H₂O₂ (Sigma-Aldrich).

Al termine dell' incubazione, le cellule sono state staccate e raccolte in 3ml di PBS. Le cellule sono state centrifugate alla velocità di 600 x g per 10 minuti alla temperatura di 4°C. Il pellet contenente le cellule è stato risospeso in un'Eppendorf con 100 µl di tampone di lisi Ripa Buffer (50 mM Tris-cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet (NP-40), 0.25% Na-deossicolato (DOC)) e 2 µl di una miscela di inibitori delle proteasi (Roche). Per facilitare la lisi le cellule sono state poste in agitazione a 4°C per 40-45 minuti. Successivamente sono state centrifugate a 14.000g per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante ottenuto è stato processato secondo il metodo di Laemmli (Laemmli, 1970): dopo l'aggiunta di Sample buffer 4x e 1 mM N-etilmaleimmide (NEM,Sigma), i campioni vengono denaturati ad una temperatura di 100°C per 5 minuti, raffreddati e caricati nel gel di poliacrilammide.

4.2.2 Transfezione transiente

La trasfezione è stata eseguita con LIPOFECTAMINE™ 2000 (Invitrogen). Le cellule vengono transfettate con il plasmide pcDNA3 contenente il gene dsRPF (*Discoma sp. red fluorescent protein*) che ci è stato fornito dal gruppo del prof. Scorrano (VIMM); il costrutto è commercialmente denominato *MitoRed*. Un volume di plasmide pari a 6 µg viene diluito in 50 µl di OptiMEM^R (Gibco) e in una Eppendorf separata viene diluito 1µl di Lipofectamina in 50 µl di OptiMEM^R. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente tutto il contenuto dell'Eppendorf plasmide-OptiMEM^R viene trasferito nell'Eppendorf contenente Lipofectamina-OptiMEM^R e lasciato per altri 20 minuti a temperatura ambiente. Su ogni vetrino del diametro di 24 mm, precedentemente sterilizzato, vengono fatte aderire le cellule 24 ore prima della trasfezione. La concentrazione di cellule piastrate su ogni vetrino è pari a 2-3 x 10⁵ cellule in 2 ml di terreno completo. Per la trasfezione, le cellule vengono poste in mezzo di coltura privo di antibiotici e di FCS e a tale terreno viene aggiunta la miscela di Lipofectamina-plasmide. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C viene aggiunto il siero in concentrazione pari al 10% del volume finale. Dopo circa 24 ore di incubazione, le cellule raggiungono il grado di confluenza idoneo alla sperimentazione.

4.2.3 Trattamento con H₂O₂ di cellule transfettate con il plasmide *MitoRed*

Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule contenute nei pozzetti sono state lavate con tampone HBS-sodio in modo da allontanare il mezzo di coltura. Dopo il lavaggio, le cellule sono state poste in 1 ml di HBS-sodio al quale sono state aggiunte 0,5, 1 e 2 mM di H₂O₂. Gli effetti dell'ossidazione sono stati osservati mediante microscopia confocale o ad epifluorescenza.

4.3 Immunofluorescenza

4.3.1 Analisi delle cellule HL-1 e MEF mediante microscopia

Per lo studio della morfologia e della dinamica mitocondriale, in seguito a stimolazione con H₂O₂ sono stati allestiti dei vetrini sterili del diametro di 24 mm ai quali sono state fatte aderire le cellule HL-1 e MEF, secondo la metodica precedentemente descritta.

Le cellule giunte a circa l'80-90% di confluenza sono state sottoposte al protocollo di trasfezione descritto al paragrafo 4.2.2, in modo da far esprimere alle cellule la proteina fluorescente MitoRed ($\lambda_{ecc}=558\text{nm}/\lambda_{emiss}=585\text{nm}$) che consente di evidenziare i mitocondri. Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule adese al vetrino, posto in un apposito portavetrini, sono state lavate con 1ml di tampone HBS-sodio a 37°C e mantenute in uno stesso volume di tampone. La morfologia mitocondriale dei fibroblasti murini è stata osservata utilizzando un microscopio invertito Olympus IMT-2 dotato di una sorgente di luce a xenon (75W) per l'epifluorescenza, di una telecamera CCD a 12 bit e di un obiettivo 60X ad immersione in olio di paraffina. Per l'analisi della dinamica mitocondriale nelle cellule HL-1, sono state acquisite 30 immagini per ciascuna condizione sperimentale ad un intervallo di tempo di 30 secondi mediante il microscopio confocale Ultraview 100, utilizzando un obiettivo 60X ad immersione in olio di paraffina. Dopo 5 minuti dalla prima acquisizione, direttamente nella soluzione di HBS che ricopriva le cellule, sono state aggiunte le seguenti concentrazioni di H₂O₂: 2mM, 1mM e 0.5mM. Sono stati inoltre effettuati esperimenti di controllo in assenza di perossido di idrogeno. Le immagini sono state elaborate utilizzando il software Metamorph (Universal Imaging).

4.4 Trattamento di cuore isolato di ratto

Il metodo di perfusione cardiaca seguito in questi studi è stato quello di Langendorff (Langendorff,1895). Il principio base della perfusione secondo il metodo di Langendorff è di pompare nel tratto ascendente dell'aorta attraverso una cannula il sangue o qualsiasi liquido ossigenato atto a mantenere l'attività cardiaca. Durante la perfusione retrograda, trovando chiusa la valvola aortica, il liquido viene dirottato nelle arterie coronariche e attraverso il sistema vascolare coronarico, il perfusato fuoriesce dal seno coronarico che si apre nell'atrio destro e nell'arteria polmonare. In teoria, se non vi è sfondamento delle valvole aortiche, le cavità cardiache rimangono vuote durante tutta la riperfusione.

Sono stati utilizzati ratti adulti albini di ceppo Wistar di entrambi i sessi e del peso di circa 250-300 g. Essi, prima dell'espianto, venivano anestetizzati con Zoletil 100 (Tiletamina cloridrato-Zolazepam cloridrato), alla dose di 10.5 mg/kg di peso corporeo, mediante iniezione per via intraperitoneale. Al raggiungimento dell'anestesia profonda, valutata dall'assenza di riflessi corneali, è stato inciso il diaframma ed aperta la cassa toracica, la quale è stata sollevata sopra la testa dell'animale e tenuta in posizione per mezzo di una pinza.

Il cuore è stato espantato in modo da asportare contemporaneamente dal corpo del ratto cuore, parte dei polmoni e del timo.

Gli organi prelevati sono stati rapidamente immersi in una soluzione salina, la stessa impiegata per la successiva perfusione, raffreddata a 4°C in modo da interrompere immediatamente l'attività contrattile. Timo, polmoni e pericardio sono stati rimossi espantati e con l'ausilio di una pinza a punte sottili ed è stata praticata una piccola incisione nell'aorta stessa a livello dell'inserzione dei vasi carotidei.

A flusso azzerato, controllando che non vi fossero eventuali bolle nella linea di perfusione, il tratto di aorta ascendente è stato poi suturato ad una cannula metallica (diametro esterno 2.2 mm, interno 1.7 mm) elemento terminale dell'apparato di perfusione, attraverso cui il mezzo salino raggiunge il circolo coronarico. Completata la legatura aortica, si è dato inizio alla perfusione, innalzando gradualmente il flusso, assicurato da una pompa peristaltica (Gilson Miniplus 2), fino al valore di 10 ml/min. Dopo aver effettuato l'apertura dell'arteria polmonare per facilitare il deflusso della circolazione coronarica, il cuore è stato posto in una camera riscaldata al fine di garantire per convezione il mantenimento della temperatura tissutale a 37°C.

4.4.1 Condizioni di perfusione

La perfusione aortica retrograda è stata mantenuta con il mezzo di perfusione Krebs-Henseleit, contenente: 118mM NaCl; 4.7mM KCl; 0.6mM MgSO₄; 25mM NaHCO₃; 2.15mM KH₂PO₄; 1.69mM CaCl₂ e glucosio 11mM come substrato energetico.

Portato alla temperatura di 37°C, il medium è stato ossigenato con una miscela di O₂/CO₂ al 95% di ossigeno e 5% di anidride carbonica per 30 minuti prima dell'inizio della perfusione. Il pH della soluzione risultante è 7.4.

Dopo un periodo di equilibratura di circa 20 minuti, i cuori sono stati perfusi in condizioni di aerobiosi o con 1mM H₂O₂.

- Aerobiosi: ottenuta perfondendo il cuore con il medium ossigenato e ad un flusso costante di 10 ml/minuto.
- Perfusiones con H_2O_2 : ottenuta perfondendo il cuore con 1mM H_2O_2 per 15 minuti ad un flusso costante di 10 ml/minuto.
- Ischemia senza flusso: eseguita dopo il periodo di equilibrasione arresando completamente il flusso (0 ml/min), per 45 minuti.
- Ripperfusione: dopo il periodo di ischemia sono state ripristinate gradualmente le condizioni iniziali di flusso (10 ml/min) che sono state mantenute successivamente per 15 minuti.

4.5 Estrazione di mitocondri da cuore di ratto

I mitocondri sono stati ottenuti da cuori di ratti Wistar del peso di circa 300 grammi; vista la bassa resa in proteine mitocondriali sono stati utilizzati almeno due organi. I cuori, una volta isolati, sono stati immediatamente trasferiti in circa 20 ml di mezzo freddo, mantenuto ad una temperatura di 4 °C contenente 75 mM saccarosio, 225 mM mannitolo, 20 mM HEPES-Tris, 1mM EGTA-Tris e BSA 0,5% a pH 7,4. Sono stati sminuzzati accuratamente, lavati più volte per eliminare l'eccesso di sangue e omogenizzati in tre passaggi di cinque secondi ciascuno utilizzando un omogenizzatore Ultra Turrax. Le cellule rimaste intatte, i nuclei ed eventuali frammenti di tessuto sono stati fatti sedimentare a 480 x g per 6 minuti usando una centrifuga Sorvall RC-5B refrigerata a 4 °C. Il sovrantante ottenuto è stato filtrato attraverso un setaccio di nylon e nuovamente centrifugato a 10800 x g per 10 minuti. Il pellet mitocondriale è stato risospeso utilizzando il mezzo privo di BSA e nuovamente centrifugato a 7650 x g per 10 minuti. Al termine il pellet ottenuto è stato risospeso in un piccolo volume di mezzo, circa 200 µl e la concentrazione proteica determinata mediante la reazione del Biureto. Tutte le operazioni sono state eseguite in un bagno di ghiaccio dove i mitocondri sono stati conservati fino al loro utilizzo.

4.5.1 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata mediante la reazione del biureto. In due tubi sono stati messi: 1ml H_2O milliQ, 1,5 ml di reattivo e 0,5 ml di desossicolato di sodio all'1%. In un tubo sono stati aggiunti 20 µl di sospensione mitocondriale, mentre l'altro campione è stato usato come bianco. Per accelerare la reazione i tubi sono stati immersi per un minuto in acqua bollente e successivamente raffreddati.

Si è misurata l'assorbanza dei campioni ad una lunghezza d'onda pari a 540 nm. La concentrazione proteica è stata calcolata in base ad una retta di taratura standard.

4.5.2 Rilascio di citocromo c da mitocondri isolati

Il rilascio di citocromo c da mitocondri isolati è stato misurato mediante test ELISA (RD Quantikine). Si tratta di un test ELISA su fase solida a sandwich.

I mitocondri isolati da cuore di ratto secondo la metodica descritta precedentemente, sono stati risospesi nel buffer sperimentale (125 mM KCl, 10 mM Tris-MOPS, 10 μ M EGTA-Tris, 1mM P_i , 5 mM glutammato, e 2,5 mM malato, pH 7,4) alla concentrazione finale di 0,5 mg/ml e sono stati lasciati per 10 minuti in incubazione a 25°C. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 7000 x g. Il supernatante è stato separato dal pellet ed il pellet è stato accuratamente risospeso nel buffer sperimentale sopra descritto. La misurazione del contenuto relativo di citocromo c è stata eseguita seguendo le procedure indicate dal produttore del kit. Sia il sovrinatante che il pellet sono stati diluiti 1:20 in una soluzione di PBS contenente lo 0.5% Triton X-100 (R&D Systems). Successivamente sono stati messi 100 μ l di campione all'interno dei pozzetti dell'apposita piastra fornita dal produttore del kit. Alla piastra è fissato un anticorpo monoclonale anti citocromo c. Dopo l'aggiunta della sospensione mitocondriale viene aggiunto un secondo anticorpo coniugato HRP in grado di riconoscere il citocromo c. I campioni vengono quindi lasciati 120 minuti in incubazione. Successivamente si eseguono 4 lavaggi con wash buffer (RD Quantikine) al termine dei quali vengono aggiunte le soluzioni A e B (RD Quantikine) contenenti i substrati per l'HRP. Dopo 30 minuti di incubazione si effettua la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm. Il rilascio di citocromo c è stato calcolato come percentuale della quantità di citocromo c nella frazione supernatante sulla quantità di citocromo c totale che risulta essere pari alla somma del citocromo c nel sovrinatante e nel pellet.

4.6 Immunolettroforesi

4.6.1 Preparazione di omogenato da tessuto di cuore di ratto

Dopo l'espanto, i campioni di cuore di ratto sono conservati in azoto liquido e sono poi stati tagliati al microtomo termostato alla temperatura di -24°C in fette dello spessore di 10 micron. Le fette sono state riposte in Eppendorf precedentemente tarate e lasciate raffreddare nel microtomo. Il tessuto così ottenuto è stato sospeso in una soluzione di PBS addizionata con 5mM EDTA quale chelante di metalli o ioni bivalenti.

Il tampone era stato precedentemente degasato e trattato con gas inerte. La sospensione così ottenuta è stata agitata per mezzo del Vortex per pochi secondi e centrifugata per 10 minuti alla temperatura di 4°C con centrifuga (Microfuge E, Beckman) al fine di separare il pellet dal sovrantante contenente le proteine citoplasmatiche.

Il pellet è stato solubilizzato in una soluzione di Sample Buffer 4x. Tale soluzione è stata aggiunta in un volume proporzionale alla quantità di campione in modo tale da ottenere la stessa concentrazione di campione nelle varie Eppendorff, seguendo la proporzione 11 mg di campione in 187 µl di tampone. La sospensione così ottenuta è stata fatta bollire per 10 minuti e un'aliquota è stata aggiunta di β-mercaptoetanol quale riducente dei ponti disolfuro. I campioni così preparati sono stati caricati per mezzo di una microsiringa in un gel di poliacrilammide.

4.6.2 Determinazione della concentrazione proteica

La determinazione della concentrazione proteica è stata eseguita mediante il metodo di Bradford. In una cuvetta di plastica da 1 ml sono stati introdotti 200µl di reattivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories), contenente 100 mg/ml di Coomassie Blue G-250 etanol ed acido fosforico. Il colorante G-250 interagisce con i gruppi amminici delle proteine, portando ad uno slittamento del picco di assorbimento da $\lambda=450\text{nm}$ del colorante libero a $\lambda= 595\text{nm}$ del colorante in forma legata. Al reattivo sono stati aggiunti 2µl di campione e 798µl acqua distillata. Il reattivo unitamente all'acqua distillata è stato utilizzato come riferimento. Mediante spettrofotometro (Uvikon 810P, Kontron Instruments) è stata misurata l'assorbanza a $\lambda=595\text{nm}$ della soluzione alla quale viene sottratto il valore di assorbanza del riferimento. Il valore della concentrazione viene quindi estrapolato da una retta di taratura precedentemente costruita misurando l'assorbanza di campioni di albumina di siero bovino a concentrazione nota.

4.6.3 Preparazione di gel di poliacrilammide (Laemmli, 1970a)

L'elettroforesi è stata condotta su gel di poliacrilammide a gradiente 4-12% nel *running gel* e al 5% nello *stacking gel* (preparato in lastre di vetro di dimensione variabile e di spessore di 1mm) utilizzando le seguenti miscele:

Acrilamide/bisacrilammide: acrilamide 30% e bisacrilammide 0.8%

Lower Tris/HCl (4x): 1.5M Tris-HCl e 0.4%, SDS, pH 8.8

Upper Tris/HCl (4x): 0.5M Tris-HCl e 0.4% SDS, pH 6.8

Running buffer (4x): 1M Tris-HCl, 0.77M glicina, 0.4 %SDS

Per la preparazione del *running gel* vengono miscelate due soluzioni di poliacrilammide al 4 e al 12% mediante l'utilizzo di una pompa peristaltica. In questo modo si ottiene un gel caratterizzato dal progressivo e graduale restringimento delle maglie del polimero che lo costituisce.

4.6.4 Corsa elettroforetica

La corsa elettroforetica è stata eseguita applicando una differenza di potenziale di 100 Volt quando le proteine si trovano nello *stacking gel*, successivamente è stato applicato un voltaggio di 150 Volt quando le proteine si trovano all'interno del *running gel*. Essa è stata interrotta dopo 90 minuti circa, una volta avvenuta la fuoriuscita del Blu di Bromofenolo (tracciante) dal gel. La corsa elettroforetica è stata effettuata a temperatura ambiente utilizzando l'apparecchio Electrophoresis Power Supply ST504D (Apelex) programmato in modo tale da garantire un voltaggio costante al valore impostato.

4.6.5 Preparazione di estratti proteici per la corsa elettroforetica

I campioni proteici sono stati analizzati previa denaturazione secondo il metodo di Laemmli (Laemmli, 1970): dopo l'aggiunta di Sample buffer 4x e 1mM NEM (N-etilmaleimmide), sono stati scaldati a $T = 100^{\circ}\text{C}$ per 5 minuti, raffreddati e caricati nel gel.

4.6.6 Analisi delle proteine mediante elettroforesi bidimensionale redox

L'elettroforesi bidimensionale redox consiste nel separare le proteine mediante due corse elettroforetiche: la prima in condizioni non riducenti, la seconda in presenza di β -mercaptoetanolo quale riducente (figura 11).

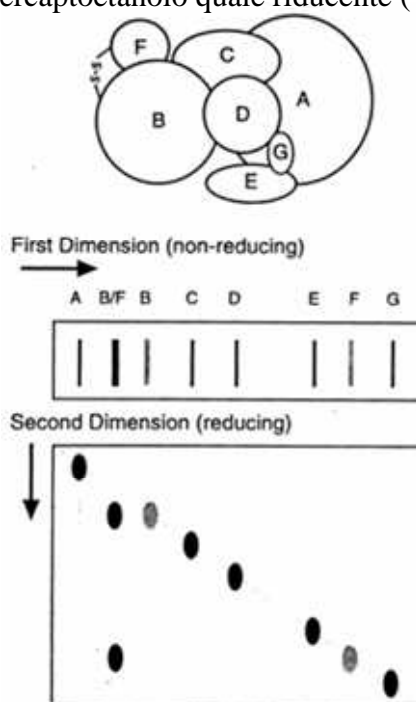


Figura 11. Analisi della presenza di ponti disolfuro utilizzando l'elettroforesi bidimensionale redox. In questo ipotetico complesso multiproteico, le proteine B e F sono legate da ponti disolfuro reversibili. Mediante elettroforesi le due proteine migrano come complesso in un primo gel, in condizioni non riducenti, mentre vengono separate attraverso una seconda corsa effettuata in condizioni riducenti (con β -mercaptoetanolo) posizionandosi al di sotto della diagonale.

4.6.7 Prima dimensione

Soluzioni e miscele per le corse elettroforetiche:

L'elettroforesi è stata condotta su gel di poliacrilamide al 12.5% nel *separating gel* e al 5% nello *stacking gel* (preparato in lastre di vetro di spessore di 1 mm) utilizzando le seguenti miscele: Acrilamide/bisacrilamide: 30% acrilamide e 0.8% bisacrilamide

Lower Tris/HCl (4x): 1.5 M Tris-HCl e 0.4% SDS, pH 8.8

Upper Tris/HCl (4x): 0.5 M Tris-HCl e 0.4 % SDS, pH 6.8

Running buffer (4x): 1 M Tris-HCl, 0.77 M glicina e 0.4 % SDS

La polimerizzazione del gel è stata ottenuta per aggiunta di TEMED e di una soluzione al 10% (w/v) di APS.

Sono stati utilizzati gel aventi le seguenti dimensioni:

Stacking gel: 3.5 cm di altezza e 16 cm di larghezza

Separating gel: 10 cm di altezza e 16 cm di larghezza

Prima corsa elettroforetica

Essa è stata effettuata a temperatura ambiente utilizzando l'alimentatore per elettroforesi ST504D (Apelex) programmato in modo tale da garantire un amperaggio crescente nelle seguenti condizioni: 10 mA per 45 min, 16 mA per 60 min, 24 mA per 5 ore, per ogni gel.

4.6.8 Seconda dimensione

Al termine della corsa elettroforetica sono state tagliate verticalmente le strisce di gel corrispondenti a ciascun campione, (esse possono essere utilizzate subito oppure possono essere conservate a -80°C). Le strisce di gel sono state posizionate orizzontalmente su altri gel e ricoperte con abbondante Sample buffer 4x, addizionato di 5% v/v β -mercaptoetanololo, come agente riducente. Sono stati utilizzati gel aventi composizione analoga a quelli della separazione in prima dimensione ma aventi lo spessore di 1.5 mm e le seguenti dimensioni:

Stacking gel: 5 cm di altezza e 16 cm di larghezza

Separating gel: 9 cm di altezza e 16 cm di larghezza

4.6.9 Immunoblot da SDS-PAGE

Sono stati allestiti i supporti per i gel da utilizzare per il trasferimento delle proteine sulla matrice di nitrocellulosa o di PVDF riattivato in metanolo, preparando dei rettangoli di carta assorbente che, dopo immersione nel tampone di trasferimento (192mM glicina, 25mM TRIS, 20% metanolo), sono stati disposti sopra una base spugnosa.

Su di questi sono stati posti i gel. Al di sopra dei gel, evitando la presenza di bolle, è stata posta una membrana di nitrocellulosa (0.45 micron Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad Laboratories) o di PVDF (0.2 micron Immun-Blot PVDF membrane, Bio-Rad Laboratories). L'aderenza tra ciascun gel e la corrispondente membrana è garantita perciò dalla sovrapposizione di più strati di carta assorbente e da uno strato di materiale spugnoso. Il tutto, mantenuto rigido grazie ad una impalcatura di plastica che funge da supporto, è stato inserito nella vasca per il blotting in modo tale da rivolgere il gel verso il catodo e la membrana verso l'anodo. Le proteine sono state trasferite a 4°C utilizzando l'alimentatore 250/2.5 (Bio-Rad Laboratories) a corrente costante pari a 150 mA per un tempo variabile da 16 a 20 ore oppure con corrente costante pari a 400 mA per 2 ore.

4.6.10 Colorazione con Rosso Ponceau

Per verificare il trasferimento delle proteine le membrane sono state colorate immergendole per 5 minuti in una soluzione contenente 0.1% Ponceau S (Sigma) e 5% acido acetico. Una volta colorate le membrane, l'eccesso di colorante è stato rimosso con un breve lavaggio in una soluzione 5% acido acetico per osservare le bande delle proteine trasferitesì.

4.6.11 Saturazione

Verificato il trasferimento delle proteine, le membrane sono state saturate con una soluzione contenente 50mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, 85mM NaCl, 3% BSA, pH 8.00, incubando per 1 ora a 25°C oppure per tutta la notte a 4°C. Terminato questo processo le membrane sono pronte per le incubazioni con gli anticorpi.

4.6.12 Incubazione con anticorpi

L'anticorpo primario utilizzato nell'immunoblot è l'anticorpo monoclonale di topo anti-OPA 1 (Beckton Dickinson) diluito 1:1000 nella soluzione costituita da 50mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, 85mM NaCl, 3% BSA, pH 8.00 con NaNO₃ 0.02%. L'incubazione con l'anticorpo primario è stata protratta per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine delle 2 ore la membrana è stata lavata 3 volte per 10 minuti immergendola nel tampone di lavaggio avente composizione uguale a quello di saturazione tranne che per la presenza di 0.1% BSA e di 0.2% P40 Nonidet. In seguito è stata effettuata l'incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario, un anti mouse (Beckton Dickinson) che riconosce in modo specifico le IgG dell'anticorpo primario.

L'anticorpo secondario è stato diluito 1:3000 nella soluzione di 50mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, 85mM NaCl, 3% BSA, pH 8.00. Gli anticorpi secondari sono coniugati ad una perossidasi di rafano (HRP) che in presenza di opportuni substrati forma dei prodotti colorati o provoca l'emissione di fotoni. La rivelazione è stata eseguita dopo tre cicli di lavaggio da 10 minuti ciascuno.

4.6.13 Rivelazione per mezzo di chemiluminescenza

La soluzione per la rivelazione mediante chemiluminescenza è stata preparata al momento dell'uso. Essa è costituita da: 0.1M Tris-HCl a pH 8.5, 5.3mM H₂O₂, soluzione ECL formata da 2.5mM di luminolo sciolto in DMSO (Sigma), 0.4mM di acido para-idrossicumarico in DMSO (Sigma), diluiti in 0.1M Tris-HCl, pH 8.5. Le membrane sono state incubate con questa soluzione per un minuto e successivamente si è generato un segnale luminoso dovuto all'ossidazione operata dalla HRP a carico del luminolo. La reazione che porta alla formazione del segnale luminoso è schematizzata in figura 12.

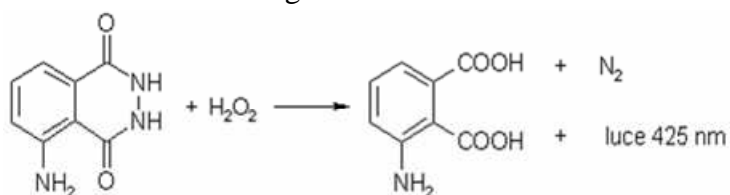


Figura 12. Ossidazione del luminolo

Tale segnale ha una durata di circa 30 minuti. La luce emessa ($\lambda_{\max} = 425\text{nm}$) è stata rivelata per mezzo di un apparecchio computerizzato che si avvale di una telecamera CCD con sistema di raffreddamento (Image Station 440CF) in grado di acquisire il segnale luminoso e di un programma (Kodak 1D) in grado di convertire tale segnale in immagine digitale. Pertanto le membrane di nitrocellulosa, dopo essere state incubate per un minuto con la soluzione di rivelazione, sono state analizzate per mezzo di questo apparecchio impostato a riceverne il segnale luminoso per diversi tempi.

4.7 Analisi di proteine mediante Blue Native page

Dopo aver estratto i mitocondri da cuore di ratto, è stata misurata la concentrazione proteica mediante la reazione del Biuret. 200 μg di sospensione mitocondriale diluita in 200 μl di buffer di isolamento sono stati centrifugati a 10000 x g per 10 minuti. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 20 μl di loading buffer (BN Loading Buffer 1X costituito da 50 mM Bis-Tris; 6 N HCl; 50 mM NaCl; Glycerol al 10% (w/v) e 0.001% Ponceau a pH 7.2) (Invitrogen) per ciascun campione a cui sono stati aggiunti 0.2 μl di inibitori delle proteasi.

Sono stati aggiunti a questo punto i seguenti detergenti alle seguenti concentrazioni:

-DDM (n-dodecyl- β -D-maltopyranoside) 2.5%

-Digitonina 1.25%

-Triton X-100 3%

Dopo l'aggiunta dei detergenti i campioni sono stati lasciati incubare a temperatura ambiente per 10 minuti e, dopo l' incubazione sono stati centrifugati a 22000 x g per 20 minuti. Al termine della centrifugazione è stato prelevato il sovrantante, contenente i complessi proteici solubilizzati dai detergenti, a cui è stato aggiunto il colorante blue di Coomassie in proporzione 1:8 al detergente.

A questo punto i campioni sono pronti per essere caricati nel gel nativo. La corsa elettroforetica viene condotta a 150 Volt (12 A iniziali) a 4°C per 30 minuti utilizzando come tampone di corsa Catode Buffer Dark Blue (Invitrogen). Successivamente la corsa procede a 200 Volt, a 4°C per circa 90 minuti utilizzando come buffer Catode Buffer Light Blue (Invitrogen).

Terminata la corsa si procede con la seconda dimensione oppure con Western Blot del BN-PAGE.

Per effettuare la seconda dimensione è stata tagliata dal gel della prima dimensione la lane da sottoporre a 2D BN. La striscia è stata caricata perpendicolarmente rispetto al secondo gel ed è stata fermata con agarosio 0,8%. E' stato dato inizio alla corsa elettroforetica usando il buffer Catode Buffer Dark Blue (Invitrogen) addizionato dello 0.02% DDM per 30 minuti a 150 V a 4°C e, dopo 30 minuti, con Catode Buffer Light Blue (Invitrogen) addizionato di DDM 0.02% per circa 120 minuti (300 V) a 4°C.

Al termine della corsa è stato fatto il Western Blotting del Blue Native page come descritto precedentemente.

4.8 Ceppi batterici e mezzi di coltura

Per la produzione dei plasmidi codificanti i mutanti della proteina OPA 1 è stato utilizzato il ceppo batterico di *E. Coli* DH10B ed il ceppo commerciale ultracompetente XL10 Gold (Stratagene).

I mezzi di coltura utilizzati sono stati il terreno Luria Broth Base (LB) (InvitrogenTM) ed il terreno NZY (NaCl 5g/L, MgSO₄*7H₂O 2g/L, Bacto-yeast estratto 5g/L, caseina idrolizzata 10g/L, pH 7.5). Gli antibiotici ampicillina (Sigma) 100 µg/ml e puromocina (Sigma) 5µg/ml sono stati utilizzati quali agenti di selezione.

4.9 Plasmide utilizzato

Il plasmide pMSCV (Murine Stem Cell Virus) contenente il gene di *Opa 1*, codificante per l'isoforma 1 umana della proteina, è stato gentilmente fornito dal gruppo del Prof. Luca Scorrano (VIMM, Padova). Si tratta di un plasmide idoneo per la trasfezione di cellule di mammifero, contenente il gene per la β -lattamasi (Amp^R) ed il gene *pac* che codifica l'enzima puromycin N-acetyl-transferase, il quale conferisce la resistenza alla puromicina ($Puro^R$).

Il plasmide contiene anche due sequenze palindrome riconosciute dall'enzima di restrizione *AgeI*. La sequenza Ψ permette di utilizzare il plasmide per la produzione di vettori lentivirali in quanto corrisponde alla sequenza di packaging per l'inserzione dell'acido nucleico all'interno del capsido virale (figura 13).

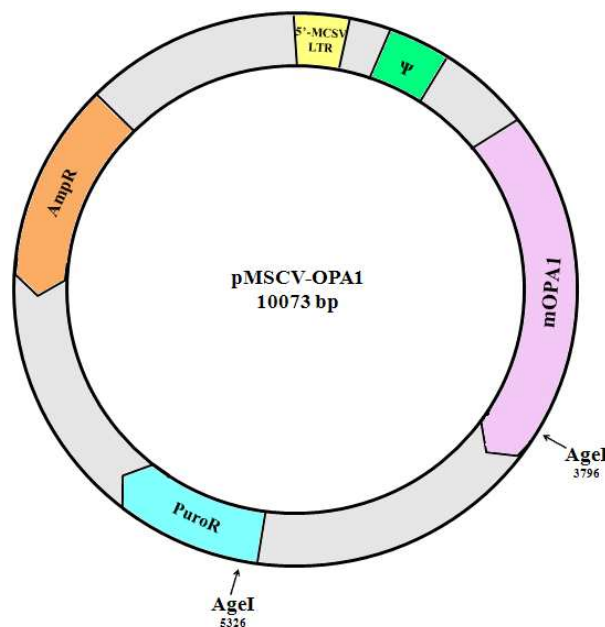


Figura 13. Analisi della presenza di ponti disolfuro utilizzando l'elettroforesi bidimensionale redox. In questo ipotetico complesso multiproteico, le proteine B e F sono legate da ponti disolfuro reversibili. Mediante elettroforesi le due proteine migrano come complesso in un primo gel, in condizioni non riducenti, mentre vengono separate attraverso una seconda corsa effettuata in condizioni riducenti (con β -mercaptoetanolo) posizionandosi al di sotto della diagonale.

4.9.1 Preparazione del plasmide pMSCV da *E. Coli* su larga scala

Per l'amplificazione e l'estrazione del plasmide pMSCV contenente *Opa 1*, il ceppo DH10B di *E. Coli* è stato fatto crescere in 100 ml di terreno di coltura LB a 37°C fino ad una $O.D._{600nm}$ di circa 1.0 (corrispondente a 1×10^9 cellule/ml).

Le colonne con resina a scambio anionico (Genomed) vengono equilibrate con 30 ml di soluzione E4 (600mM NaCl, 100mM Sodio acetato, 0,15% TritonX-100 a pH 5.0). I batteri vengono pellettati mediante centrifugazione a 3000g per 5 min a temperatura ambiente.

Si aggiungono 10ml di soluzione E1 (50mM Tris, 10mM EDTA con HCl a pH 8.0) e si risospende fino ad ottenere una sospensione omogenea. Ai batteri lisati si aggiungono 10ml di soluzione E2 (200mM NaOH, 1,0% SDS) mescolando mediante inversione fino a quando il lisato appare omogeneo e si lascia per 5 minuti a temperatura ambiente. Aggiungere ai batteri 10 ml di soluzione E3 (3.1M Potassio acetato a pH 5.0) e agitare immediatamente per inversione fino a quando si ottiene una sospensione omogenea. Centrifugare a 12.000g per 10 minuti a temperatura ambiente. Il supernatante ottenuto viene posto in colonna ed eluito per gravità, lavando poi la colonna con 60ml di soluzione E5 (800mM NaCl, 100mM sodio acetato, con acido acetico a pH 5.0).

Eluire il plasmide con 15ml di soluzione E6 (1.5M NaCl, 100mM Sodio acetato, con acido acetico a pH 5.0) ed aggiungere all'eluato 10,5ml di isopropanolo per far precipitare il plasmide mediante centrifugazione a 12.000g per 30 minuti a 4°C.

Lavare il pellet con etanolo al 70% sterile, centrifugare e lasciare asciugare il pellet. Il pellet è stato in seguito risospeso in un opportuno volume di H₂O sterile.

4.9.2 Preparazione del plasmide pMSCV da *E. Coli* su piccola scala

Per estrarre il DNA plasmidico da colonie di *E. Coli* precedentemente trasformate con il plasmide d'interesse, i batteri sono stati posti in coltura *over-night* in 5ml di terreno LB con 10µg/ml ampicillina. Un volume pari a 2 ml di coltura batterica, è stato centrifugato a 3.000 x g per 5 minuti ed il pellet è stato incubato per 5 minuti a temperatura ambiente con 100 µl di soluzione A, contenente 0,050 M Glucosio, 25mM Tris e 10mM EDTA, 1 mg/ml lisozima e 5mg/ml di RNasi.

In seguito sono stati aggiunti 200 µl di soluzione B (0,2M NaOH e 1% SDS). Dopo 5 minuti a temperatura ambiente, vengono addizionati 150 µl di soluzione C (3M potassio acetato e 11,5% acido acetico).

Dopo 5 minuti di incubazione in ghiaccio, si ottiene un aggregato bianco in soluzione costituito da DNA genomico batterico e proteine. Si centrifuga a 12.000 x g per 5 minuti, recuperando il sovrinatante in una Eppendorf sterile. Vengono aggiunti 450-500 µl di isopropanolo e si lasciano in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente.

Il DNA plasmidico precipitato viene recuperato in seguito a centrifugazione a 12.000 x g per 5 minuti. Si aggiungono 500 µl di Etanolo al 70% e si centrifuga a 12.000 x g per 15 minuti. Il pellet si risospende in 20 µl di acqua sterile e si lascia per un'ora a 4°C in modo da favorirne la solubilizzazione.

4.10 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR è una tecnica di biologia molecolare che permette l'amplificazione in vitro di una specifica sequenza di DNA, da una piccola aliquota iniziale che costituisce il filamento stampo (*template*). All'inizio si procede con la sintesi di due inneschi oligonucleotidici, *primers*, ognuno complementare a uno dei due estremi 3' del segmento duplice di DNA da amplificare: i primers fungono da innesco per la serie di reazioni catalizzate dalla DNA-polimerasi.

La sequenza di ciascun filamento viene quindi copiata nel tratto compreso tra le due regioni a cui si associano per *annealing* gli inneschi oligonucleotidici. L'enzima DNA-polimerasi amplifica a partire dai primers il segmento genico d'interesse, utilizzando i deossinucleosidi trifosfato (dNTPs) presenti nella miscela di reazione. Successivamente, i frammenti di DNA a doppio filamento che risultano, vengono denaturati e riassociati con gli inneschi.

La reazione con la DNA-polimerasi viene quindi ripetuta per un determinato numero di cicli. Ciascun ciclo è costituito da tre stadi: denaturazione termica, ibridazione o *annealing* e allungamento. Lo stadio di denaturazione termica consiste in un breve periodo a temperatura superiore ai 90°C, in cui i doppi filamenti di DNA si separano a causa della rottura dei ponti idrogeno presenti tra le coppie di basi dei filamenti complementari.

La fase di ibridazione o *annealing* permette il riconoscimento e appaiamento dei primers Forward e Revers con le estremità 3' dei filamenti di DNA che devono essere amplificati.

Nello stadio di allungamento avviene la reazione di polimerizzazione in cui l'enzima DNA-polimerasi, partendo dal primer d'innesco, sintetizza la sequenza di DNA complementare in direzione 3'-5', incorporando i deossinucleotidi trifosfato (dNTPs) presenti nella miscela di reazione. Per ogni ciclo di amplificazione la quantità del DNA a doppio filamento aumenta esponenzialmente. Per la reazione viene utilizzato l'enzima termostabile Taq DNA polimerasi, isolato dal batterio *Thermus Aquaticus*, in quanto è possibile effettuare numerosi cicli di amplificazione con un'unica somministrazione di enzima. Inoltre raggiunge la sua attività massimale a temperature comprese tra 70°C-75°C, temperatura che consente l'appaiamento specifico tra le basi del filamento di DNA e gli inneschi oligonucleotidici. Di conseguenza diminuisce la probabilità che i primers si associno a sequenze di DNA in modo aspecifico. Per la miscela di reazione è stato utilizzato il kit commerciale *Expand High Fidelity PCR System dNTPack* (Roche):

- 4 ng DNA stampo
- 2.5mM dNTPs
- 5 μ M primer forward
- 5 μ M primer reverse
- 1X buffer polymerase+MgCl₂

H₂O sterile fino ad un volume finale di 25 μ l.

E' stato usato il ciclatore termico GeneAmp® System 9700 della ditta PE Applied Biosystems programmato secondo lo schema riportato in figura 14.

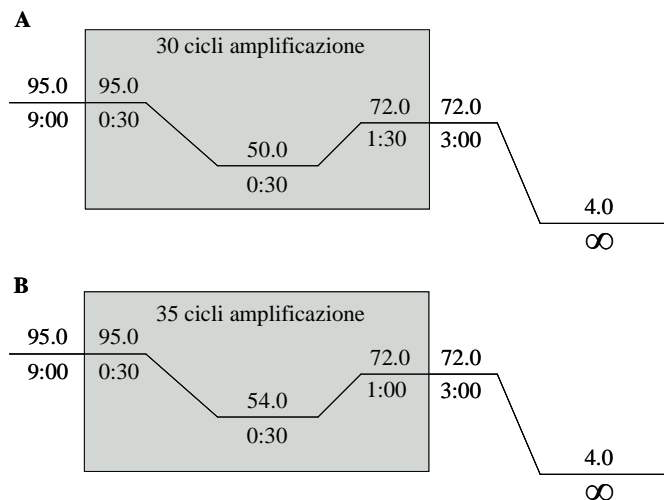


Figura 14. Profilo termico di amplificazione del plasmide (A) e dei frammenti (B).

4.11 Corsa elettroforetica di DNA su gel di agarosio

L'analisi del DNA a doppio filamento è stata eseguita utilizzando la tecnica di elettroforesi su gel di agarosio.

L'agarosio viene sciolto ad una concentrazione pari a 1% in un tampone TAE (Tris-acetato buffer costituito da 40mM Tris base, 20mM Acido Acetico glaciale e 1mM di EDTA a pH 8,0) e addizionato con etidio bromuro (Sigma) alla concentrazione finale di 0,5 μ g/ml. Tale sostanza, intercalante del DNA, ha capacità fluorescenti se esposta alla luce ultravioletta e permette perciò di rilevare i frammenti di DNA migrati attraverso il gel. La corsa elettroforetica si esegue in un'apposita vaschetta in cui il gel viene immerso nel tampone di corsa TAE 1X a 80 V per 60 minuti. La generazione di un campo elettrico permette alle molecole di DNA cariche negativamente di migrare verso il polo positivo e di separarsi in bande diverse a seconda del loro peso molecolare. Per visualizzare le bande di DNA, il gel viene posto su di un trans illuminatore che emette luce UV (200< λ <400nm). La dimensione delle molecole di DNA che costituisce le diverse bande si determina per confronto con un campione di pesi molecolari noti 2 Log DNA Ladders (Bio Labs).

4.12 Mutagenesi del gene *Opa 1* sul plasmide pMSCV mediante PCR

Le variazioni a livello dei residui cisteinici sono state ottenute effettuando una mutagenesi sito specifica a livello delle triplette nucleotidiche codificanti all'interno del gene *Opa 1*. La mutagenesi di un nucleotide all'interno di una tripletta comporta la modifica dell'aminoacido corrispondente nel processo di traduzione. Il nostro obiettivo è quello di mutagenizzare i codoni codificanti per i residui cisteinici all'interno del dominio *coiled coil* di *Opa 1* in residui serinici.

Per attuare questa metodica è necessario progettare dei primers idonei contenenti i nucleotidi mutati, sintetizzati dalla ditta Sigma.

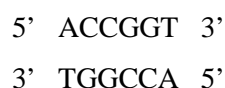
Tab. I Progettazione dei primers utilizzati. Primers per mutagenesi sito specifica dei residui cisteinici (C853S, C853-6S e C874S) e primers per l'allungamento dei frammenti contenenti tali residui amminoacidici (MutW e MutC).

AA da mutare		Sequenza primers	AA mutato
Cys 853 (TGT)	Primer For	5'-GCTCTAAATCATTCTAACCTTTGTC-3'	Ser 853 (TCT)
	Primer Rev	5'-GACAAAGGTTAGAATGATTTAGAGC-3'	
Cys 874 (TGC)	Primer For	5'-GAGCTGGAATCCAATGACGTG-3'	Ser 874 (TCC)
	Primer Rev	5'-CACGTCATTGGATTCCAGCTC-3'	
Cys 853-6 (TGT)	Primer For	5'-TAAATCATTCTAACCTTTCTCGCAGAGGT-3'	Ser 853-6 (TCT)
	Primer Rev	5'-ACCTCTGCGAGAAAGGTTAGAATGATTTA-3'	
Mut W		5'-ACAATGCTTTGGAAGACCGGT-3'	
Mut C		5'-TTGGCGCCTACCGGTGGAT-3'	

4.12.1 Taglio enzimatico del DNA con l'endonucleasi di restrizione

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi di origine batterica che riconoscono specifiche sequenze di DNA e tagliano la doppia elica in presenza di esse.

L'enzima AgeI (BioLabs), da noi utilizzato, presenta come sito di riconoscimento:



Le digestioni sono state effettuate utilizzando 5U di enzima per 2µl di DNA plasmidico in un volume finale di 20µl in tampone consigliato dalla ditta fornitrice. L'incubazione avviene a 37°C per 2 ore e, successivamente, a 65°C per 20 minuti per inattivare l'enzima.

4.12.2 Defosforilazione del plasmide pMSCV

L'enzima AgeI è stato utilizzato come unico enzima di restrizione per la digestione del plasmide pMSCV-*Opal*. Per evitare la ligazione delle estremità del vettore, previa inserzione il frammento è stato trattato con l'enzima Fosfatasi Antartica (BioLabs) che catalizza la rimozione del fosfato 5', evitando così che il plasmide si richiuda.

La defosforilazione viene effettuata utilizzando 5U di fosfatasi per 1 µg di DNA plasmidico in 20 µl totali di buffer per fosfatasi 1X BioLabs. La miscela di reazione viene mantenuta a 37°C per 15 minuti ed in seguito a 65°C per 5 minuti per bloccare l'attività enzimatica.

4.12.3 Ligazione

L'inserimento dei frammenti di DNA nel plasmide digerito viene eseguito tramite l'utilizzo dell'enzima T4 DNA Ligasi (Roche). L'enzima è in grado di catalizzare la formazione di legami fosfodiesterici, unendo il gruppo 5'-fosforico con il gruppo 3'-ossidrile dei deossinucleotidi adiacenti a livello del sito di inserzione nel DNA.

La ligazione viene effettuata utilizzando 1U di ligasi per 0.1µg di DNA plasmidico in un volume totale di 20 µl di buffer di ligazione 1X consigliato dalla ditta fornitrice. La reazione avviene ad una temperatura di 16°C per 16 ore.

4.12.4 Preparazione di batteri chimico competenti DH10B

Una singola colonia del ceppo DH10B di *E.Coli* viene inoculata *over-night* in 2 ml di terreno LB liquido senza antibiotici a 37°C.

A 500 µl di precoltura vengono addizionati 50 ml di terreno LB non selettivo ed i batteri vengono mantenuti a 37°C per circa un' ora fino ad una O.D._{600nm} di circa 0,2-0,3. La coltura viene suddivisa in 2 provette da 50 ml sterili, viene posta in ghiaccio per 20 minuti e, successivamente, centrifugati a 4100 x g per 5 minuti a 4°C. Il pellet viene risospeso in 25 ml di CaCl₂ 0,1M freddo, mantenendolo a 4°C. La sospensione viene unita in un'unica provetta e mantenuta in ghiaccio per 30 minuti. In seguito a centrifugazione (4100 x g per 5 minuti a 4°C), il pellet viene risospeso in 1 ml di CaCl₂ 0.1M addizionato con 20% glicerolo. I batteri vengono aliquotati in volumi pari a 50 µl e conservati a -80°C.

4.12.5 Trasformazione batteri *E. Coli* DH10B

Alle aliquote da 50 μ l di batteri chimico competenti, una volta scongelate in ghiaccio, sono stati aggiunti 20 μ l di ligazione. I batteri vengono posti in ghiaccio per 30 minuti e successivamente portati a 42°C per 90 secondi. È necessario aggiungere immediatamente 900 μ l di terreno LB liquido privo di ampicillina. Dopo 1h di crescita a 37°C, i batteri vengono centrifugati a 3000 x g per 4 minuti ed il pellet viene piastrato su terreno LB solido addizionato con ampicillina.

4.13 Mutagenesi sito diretta mediante kit commerciale QuikChange® II XL Site-directed Mutagenesis Kit

La mutagenesi condotta con il Kit *QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis* prevede l'impiego di una DNA polimerasi ad alta efficienza denominata *PfuUltra*, in grado di polimerizzare la sequenza completa del plasmide ricombinante pMSCV a partire dal primer contenente la mutazione puntiforme durante la reazione di PCR.

La miscela di reazione è costituita da:

▪ Plasmide pMSCV	10ng
▪ Primer mutato Forward 5 μ M	125ng
▪ Primer mutato Revers 5 μ M	125ng
▪ Reaction Buffer 10x	5 μ l
▪ dNTPs MIX	1 μ l
▪ Quick Solution	3 μ l

Il volume finale di reazione è pari a 50 μ l.

La reazione è stata posta nel termociclatore GeneAmpR System 9700 (Applied Biosystem) e sottoposta a 30 cicli di amplificazione secondo lo schema descritto in figura 15.

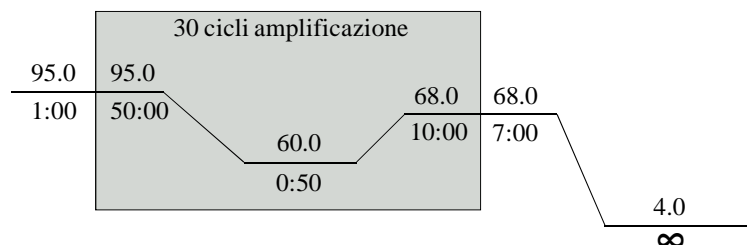


Figura 15. Profilo termico di amplificazione del plasmide pMSCV a partire da primers mutati.

Terminati i cicli di amplificazione la reazione è stata posta per due minuti in ghiaccio e vi è stato aggiunto 1 μ l di enzima di digestione *DnpI* (100 U/ μ l).

Si tratta di un endonucleasi in grado di digerire selettivamente DNA metilato di origine batterica quale il plasmide pMSCV utilizzato come *template*, mentre i filamenti di DNA di nuova sintesi, contenenti la mutazione, non sono metilati.

L'enzima PfuUltra è ad alta efficienza di mutazione, ma durante la fase di incorporazione dei nucleotidi possono verificarsi mutazioni indesiderate nella sequenza del gene *Opa 1*. Per questo motivo è necessario eseguire il sequenziamento dell'intera sequenza codificante per la proteina OPA 1 interna al vettore, accertando così l'esclusiva presenza della mutazione desiderata.

4.13.1 Trasformazione di batteri *E. Coli* X10 Gold ultracompetenti

Per eseguire la trasformazione dei batteri X10 Gold ultracompetenti sono stati aliquotati 45µl di batteri in una vial da 2,5ml posta precedentemente in ghiaccio. All'aggiunta di 2µl di β-mercaptoetanololo, segue un periodo di 10 minuti di incubazione in ghiaccio. In seguito vengono aggiunti 2µl della reazione di amplificazione precedentemente ottenuta. Dopo uno shock termico a 42°C per 30 sec, i batteri sono stati addizionati con 500µl di terreno NZY e sono stati posti a 37°C. Dopo un'ora di crescita in terreno liquido, 250µl di coltura batterica sono stati piastrati su terreno solido LB addizionato con ampicillina, quale agente di selezione.

4.14 Purificazione da gel di agarosio e da prodotto di PCR di frammenti di DNA

Al fine di estrarre e purificare da gel di agarosio il plasmide di interesse, è stato utilizzato il kit commerciale "*High Pure PCR Product Purification Kit*" (Roche). La banda d'interesse viene direttamente dal gel di agarosio posto sul trans illuminatore e se ne determina il peso. Si aggiungono 300 µl di binding buffer per ogni 100 mg di gel. L'Eppendorf contenente il gel viene posta a 56 °C per 10 minuti, agitando ogni tre minuti. Al termine del trattamento, si aggiungono 150 µl di isopropanolo ogni 100 mg di gel iniziale. A questo punto la soluzione viene caricata su colonnine di polipropilene con un apposito filtro. La soluzione viene eluita mediante centrifugazioni successive a 13.000 x g per 1 minuto, eliminando ogni volta la soluzione che si deposita nel collettore della colonnina. Al DNA, trattenuto dal filtro, vengono aggiunti 500 µl di wash buffer. In seguito a centrifugazione a 13.000 x g per 1 minuto, si aggiungono 50–100 µl di elution buffer. Dopo 2 minuti di incubazione, si ripete la centrifugazione (13.000 x g per 1 minuto) in modo da eluire il frammento d'interesse.

Il medesimo kit commerciale permette inoltre la purificazione diretta di amplificati da PCR non separati in gel di agarosio. A 100 μ l di soluzione di amplificazione da PCR vengono aggiunti 500 μ l di binding buffer, mescolando vigorosamente per inversione. I 600 μ l di soluzione ottenuta vengono posti sul filtro delle apposite colonnine e centrifugati a 13.000 x g per 1 minuto, eliminando la soluzione che è presente nel collettore. In seguito si aggiungono 500 μ l di wash buffer e si centrifuga a 13.000 x g per 1 minuto. Il DNA viene eluito per centrifugazione (1 minuto a 13.000 x g), in seguito ad incubazione per 2 minuti in 50 – 100 μ l di elution buffer.

4.15 Screening dei plasmidi ricombinanti mediante restrizione

Lo *screening* delle colonie ricombinanti, ovvero la verifica della presenza e della corretta taglia dell'inserito, è stato effettuato allestendo delle colture batteriche ed eseguendo delle mini preparazioni di DNA plasmidico, come precedentemente descritto. L'analisi dei plasmidi è stata eseguita attraverso delle digestioni con l'enzima di restrizione AgeI e la successiva osservazione, mediante elettroforesi in gel d'agarosio, della lunghezza dei frammenti ottenuti.

4.16 Preparazione di campioni per il sequenziamento

La mutagenesi condotta con il kit commerciale Quick Change II XL Mutagenesis Kit ci ha permesso di ottenere una mutazione sito specifica sul gene *Opa 1* a livello delle triplette codificanti per le cisteine 853 e 874 della proteina Opa 1. Per accertare la sola presenza della mutazione desiderata è necessario sequenziare l'intero frammento genico *Opa 1* inserito nel plasmide pMSCV. Il gene è costituito da 10.000 paia di basi e la sua sequenza presenta un' alta percentuale di adenine e guanine consecutive rendendone difficile il sequenziamento completo. Per facilitare le operazioni di sequenziamento è stato necessario suddividere tale gene in tre frammenti di dimensioni minori della lunghezza compresa tra le 1.200 e le 1.500 paia di basi. I frammenti sono stati ottenuti e amplificati mediante PCR con primers appositamente progettati. Successivamente sono stati purificati, come descritto nel paragrafo 4.14, e quantificati mediante caricamento su gel di agarosio. La preparazione dei campioni da sequenziare è stata eseguita essicando 3,2pmoli di primer e 350ng di frammento amplificato da PCR e purificato. L'essiccazione del DNA è stata effettuata mantenendo le Eppendorf alla temperatura di 65°C per un breve periodo. I campioni sono stati sequenziati dal servizio di sequenziamento BMR Genomics, che si serve dell' apparecchio ABI Prism 3700 DNA Analyzer.

4.17 Produzione di vettori Lentivirali

I costrutti pMSCV precedentemente mutati e sequenziati sono stati utilizzati per la produzione di vettori lentivirali al fine di costituire delle linee cellulari che esprimessero stabilmente la proteina d'interesse.

Le cellule Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293) sono state utilizzate come cellule di packaging per la produzione del vettore retrovirale. Dopo 24 ore dalla messa in coltura le cellule sono state co-trasfettate con i costrutti pMSCV e con il plasmide helper pIK (Ecopac), utilizzando l'agente di trasfezione Transfectin (Biorad).

Il plasmide helper contiene i geni essenziali per la replicazione virale quali i geni che codificano per proteine strutturali del capside virale. Il vettore pMSCV contiene il dominio di packaging (Ψ) in modo da poter essere contenuto dalla particella virale. Le proteine strutturali virali riconoscono l'acido nucleico del vettore (contenente la sequenza psi), ma non il plasmide helper (privo di psi). In questo modo all'interno del capside virale sarà presente soltanto il vettore pMSCV (figura 16). Il surnatante cellulare contenente il virus è stato aliquotato e conservato a -80°C .

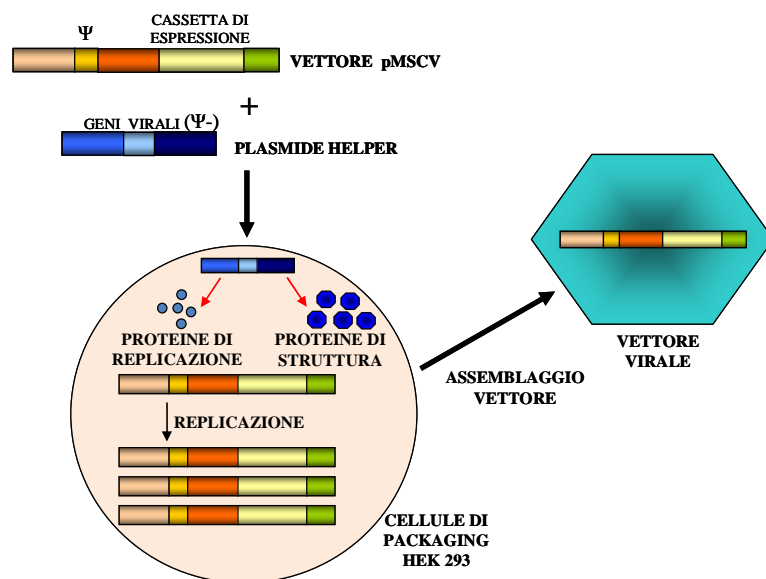


Figura 16. Produzione di vettori Lentivirali

4.16.1 Generazioni di cloni cellulari stabili mediante trasfezione con vettori lentivirali

Cellule MEF OPA $1^{-/-}$ sono state trasdotte con il retrovirus per 24 ore ed in seguito mantenute nel terreno di coltura DMEM, precedentemente descritto, ed addizionato con puromicina ($5\mu\text{g/ml}$) quale agente di selezione per il plasmide pMSCV.

In questo modo sono stati ottenuti cloni cellulari in grado di esprimere stabilmente la proteina di interesse.

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

L'obiettivo iniziale dello studio condotto durante il periodo di tesi è stato quello di verificare a livello cardiaco la presenza di eventuali modifiche a carico della proteina OPA 1, in seguito a danno ossidativo.

5.1 Effetto dello stress ossidativo sulla proteina OPA-1

Per indurre stress ossidativo a livello cardiaco è stato utilizzato un modello di cuore ripperfuso *ex-vivo* secondo il metodo di Langendorff.

Il cuore isolato di ratto è stato perfuso con perossido di idrogeno (H_2O_2) 1 mM per 15 minuti, in quanto tale protocollo consente di indurre uno stress ossidativo massimale. Un ulteriore modello di stress ossidativo in grado di indurre danno cardiaco, consiste nell'ischemia (assenza di flusso) per 45 minuti seguita da un periodo di riperfusione di 15 minuti. Cuore perfuso in condizioni normossiche per 15 minuti con la stessa soluzione salina in assenza di H_2O_2 è stato utilizzato come controllo (vedi sez. Materiali e metodi).

Per ridurre le ossidazioni dovute ad artefatti durante il processo di estrazione è stato aggiunto l'acido etilendiaminicotetracetico (EDTA), per chelare gli ioni metallici che favoriscono la formazione di specie radicaliche. Inoltre le soluzioni di estrazione sono state degasate mediante l'utilizzo di una pompa a vuoto ed insufflate con gas inerte (Argon) per ridurre la quantità di ossigeno disciolto e quindi il suo potere ossidante. Dato che le proteine ossidate sono maggiormente suscettibili alla degradazione proteica (Berlett e Stadtman, 1997) è stato aggiunto una miscela commerciale di inibitori delle proteasi (Sigma). Ogni estratto proteico è stato trattato in condizioni riducenti, mediante l'aggiunta di β -mercaptoetanololo, ed in condizioni non riducenti, in presenza di N-etilmaleimmide (NEM), agente alchilante che lega irreversibilmente i gruppi sulfidrilici impedendone l'ossidazione nel campione analizzato. I lisati proteici così ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica e successivo immunoblotting con l'anticorpo anti-OPA 1 (Becton Dickinson).

L'immunoblotting (figura 17) evidenzia la presenza, nel campione normossico, di numerose isoforme (circa cinque) della proteina OPA 1 con un peso molecolare noto compreso tra 80 e 120 KDa. Nel tessuto di cuore di ratto sottoposto ad ischemia/riperfusione e di cuore ripperfuso con H_2O_2 è evidente la formazione di complessi ad elevato peso molecolare, superiore ai 220 KDa, contenenti la proteina OPA 1.

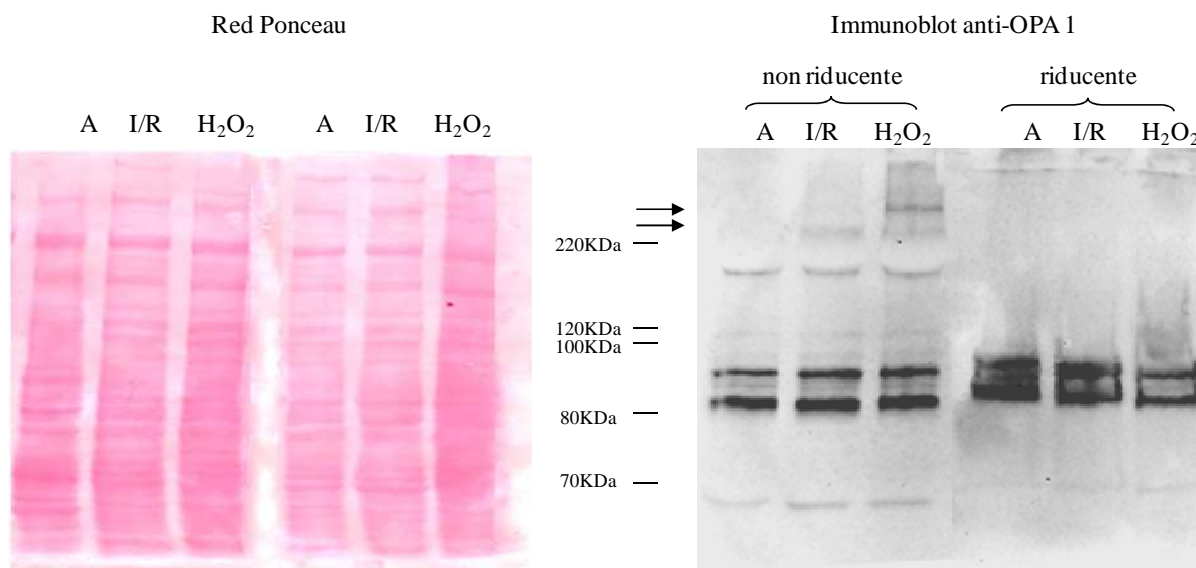


Figura 17. Effetto della riperfusione post ischemica e della perfusione con H_2O_2 sulla proteina OPA 1. Campioni di cuore di ratto perfusi in condizione normossiche (A) sono stati confrontati con campioni di cuori riperfusi per 15' in seguito a 45' di ischemia (I/R) e con campioni perfusi in condizioni con H_2O_2 1mM (H_2O_2) per 15'. Questa ultima condizione sperimentale rappresenta il più elevato insulto ossidativo. La proteina è stata estratta e denaturata secondo il metodo di Laemmli in assenza (condizione non riducente) o in presenza di β -mercaptoetanolo (condizione riducente). L'incubazione con l'anticorpo anti-OPA 1 evidenzia la comparsa di bande a più alto peso molecolare nei campioni di cuore riperfuso e perfuso con H_2O_2 rispetto al campione di controllo (\Rightarrow). Tali bande scompaiono in condizioni riducenti e sono pertanto attribuibili alla formazione di ponti disolfuro intermolecolari.

È possibile affermare che tali complessi siano dovuti alla formazione di ponti disolfuro tra residui di cisteina, in quanto le bande a più alto peso molecolare scompaiono in seguito a trattamento con β -mercaptoetanolo che riduce i ponti disolfuro.

Per confermare la presenza di modificazioni ossidative a carico della proteina OPA 1 è stata applicata la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale redox. Tale metodica consiste nel separare le proteine mediante due corse elettroforetiche: la prima in condizioni non riducenti, la seconda in condizioni riducenti in presenza di β -mercaptoetanolo (vedi sez. Materiali e metodi). In seguito a tale separazione le proteine si dispongono lungo una diagonale. Lo scopo è quello di rilevare la presenza di ponti disolfuro tra proteine che migrano come complesso nella prima dimensione, mentre vengono separate dal riducente nella seconda dimensione. Le proteine ridotte a peso molecolare minore migrano così in regioni che discostano dalla tipica diagonale.

L'estratto proteico è stato denaturato secondo il procedimento di Laemmli in assenza di riducente e le proteine sono state sottoposte ad SDS-PAGE. Successivamente utilizzando le strisce di gel contenenti le proteine separate, è stata effettuata una seconda corsa elettroforetica in presenza di β -mercaptoetanolo. In seguito ad immunoblotting con anticorpo anti-OPA 1 (figura 18) è stata osservata, nel campione di cuore riperfuso con H_2O_2 la presenza di due bande al di sotto della diagonale, corrispondenti ad almeno due isoforme monomeriche della proteina in studio.

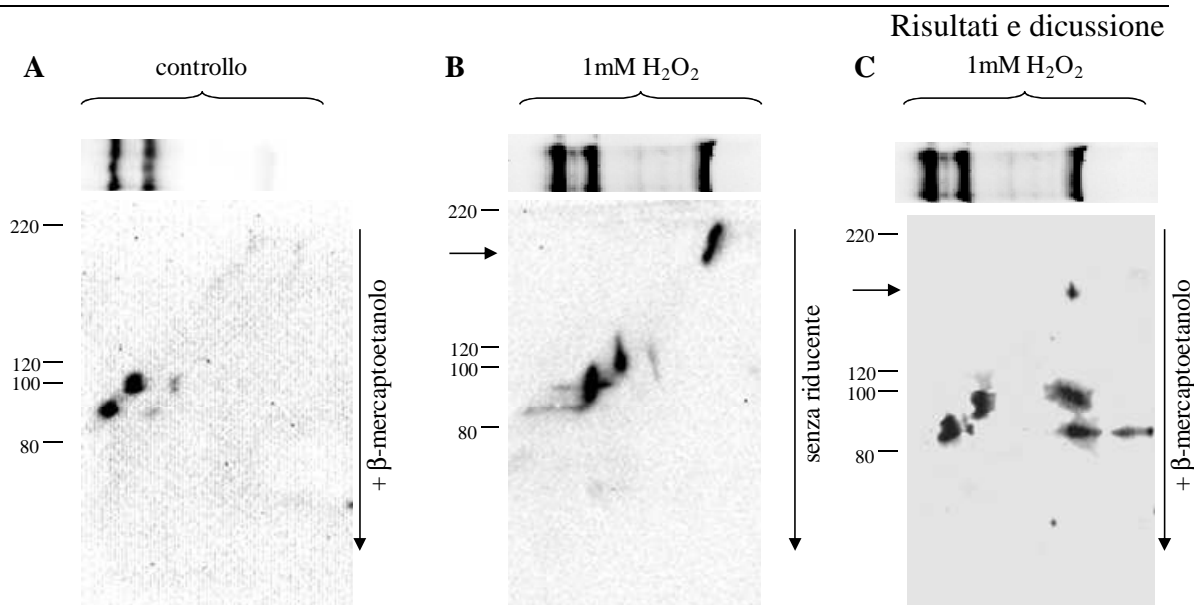


Figura 18. Elettroforesi bidimensionale redox su campioni di cuore di ratto. La diagonale riportata in figura rappresenta la migrazione di un estratto proteico totale da tessuto di cuore di ratto sottoposto ad aerobiosi (A) e riperfuso con H_2O_2 (B e C). Nel campione di controllo sono evidenti due spots tra 80 e 100 kDa corrispondenti a due isoforme monomeriche della proteina OPA 1. Tali isoforme sono presenti anche nel campione sottoposto a stress ossidativo, dove è inoltre presente un complesso a peso molecolare di circa 200 kDa (\rightarrow). In presenza di β -mercaptoetanolo (C) il complesso si disgrega ed appaiono due spots esterni alla diagonale che corrispondono alle due isoforme monomeriche di OPA 1.

Per attribuire un relazione diretta tra la formazione del complesso e la presenza di ROS, criosezioni di tessuto di cuore di controllo sono state incubate *in vitro* con due soluzioni ossidanti: soluzione Fenton A (figura 19A), contenente PBS, H_2O_2 ed EGTA, e Fenton B (figura 19B), contenente PBS, H_2O_2 , EGTA, $FeSO_4$ e NaN_3 (vedi sez. Materiali e metodi). Ambedue le soluzioni contenevano una concentrazione crescente di H_2O_2 , agente ossidante, ed una concentrazione costante di EGTA, agente chelante del calcio (per evitare la formazione di legami crociati ad opera delle transglutaminasi).

La soluzione con maggior potere ossidante (Fenton B) conteneva inoltre solfato ferroso e sodio azide. Lo ione Fe^{2+} induce la formazione del radicale idrossile a partire dall'acqua ossigenata secondo la reazione di Fenton (vedi Introduzione). La sodio azide è in grado di inibire gli enzimi citocromo c reduttasi e catalasi, quest' ultimo preposto alla conversione del perossido di idrogeno ad ossigeno ed acqua. In seguito al trattamento è stata effettuata l'estrazione proteica dalle criosezioni di tessuto secondo il metodo di Laemmli ed ogni campione è stato preparato contemporaneamente in assenza ed in presenza di agente riducente. Gli estratti proteici sono stati sottoposti ad SDS-PAGE e successivo immunoblotting con l'anticorpo anti-OPA 1.

Come evidenziato in figura 19, si ha la formazione di aggregati ad alto peso molecolare di OPA 1 in modo proporzionale alla concentrazione di H_2O_2 presente all'interno della soluzione di incubazione. In particolare la soluzione Fenton B, a maggior potere ossidante, induce una formazione più elevata di complessi.

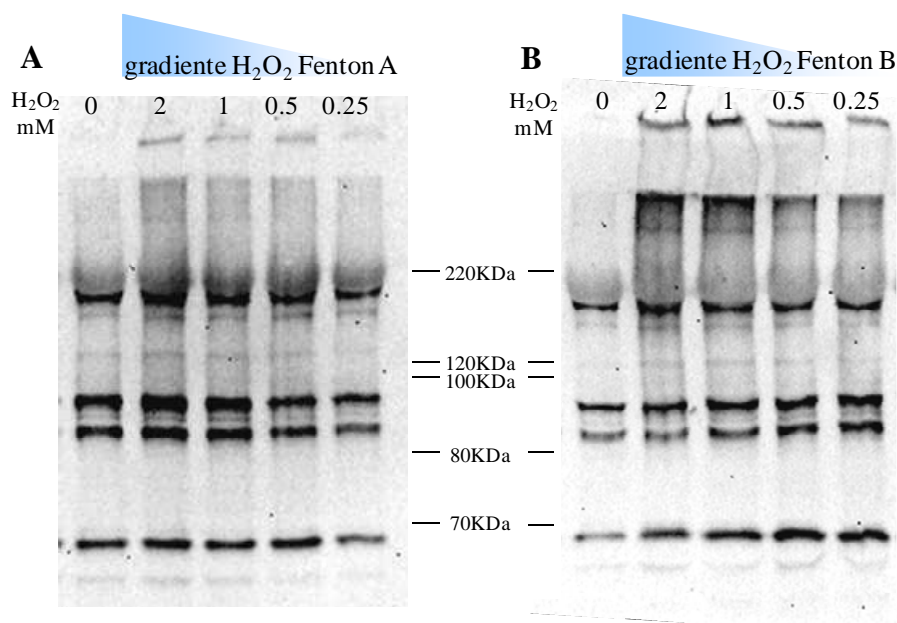


Figura 19. Il trattamento in vitro di campioni di cuore di ratto con soluzioni contenenti differenti concentrazioni di H_2O_2 ed $FeSO_4$ evidenzia l'ossidazione della proteina OPA 1. Gli estratti proteici sono stati trattati per 30' a temperatura ambiente con le seguenti soluzioni ossidanti:

Fenton A -PBS contenente 2mM H_2O_2 , 2 mM EGTA (**A**)

Fenton B -PBS contenente 2mM H_2O_2 , 2 mM EGTA, 2 mM $FeSO_4$, 0.02% NaN_3 (**B**)

Le soluzioni utilizzate per l'incubazione nei diversi campioni sono state diluite in modo da ottenere le seguenti concentrazioni di H_2O_2 : 0 mM (controllo); 0.25 mM; 0.5 mM; 1 mM; 2 mM. L'immunoblot evidenzia la formazione di aggregati ad alto peso molecolare della proteina OPA 1 nei campioni trattati, in modo direttamente proporzionale alla concentrazione di H_2O_2 presente nella soluzione di incubazione. Tale evidenza è maggiore nel pannello B in cui i campioni sono stati trattati con la soluzione ossidante Fenton B.

Nei campioni trattati con la soluzione Fenton B è evidente la formazione aggregati di dimensioni tali da non riuscire a migrare all'interno del gel. Per valutare l'entità di tali complessi proteici è stata applicata una metodica elettroforetica denominata Blue Native-PAGE, messa a punto in collaborazione con il gruppo del Prof. Luca Scorrano (Istituto Veneto di Medicina Molecolare (VIMM), Padova) su mitocondri isolati. Questa tecnica permette di evidenziare l'eventuale presenza di complessi proteici aventi un peso molecolare molto elevato, anche superiore a 1000 KDa (vedi sez. Materiali e metodi). Per l'estrazione dei complessi dalla membrana mitocondriale, i mitocondri isolati da cuore di ratto in aerobiosi (figura 20A) e da cuore di ratto perfuso con 1 mM H_2O_2 per 15 minuti (figura 20B) sono stati trattati con detergenti in grado di separare aggregati con un diverso peso molecolare.

In particolare mediante l'incubazione con 2.5% n-dodecil- β -D-maltoside (DDM) per 10 minuti a temperatura ambiente è possibile isolare i complessi a peso molecolare molto elevato in quanto il detergente è tra i più forti. Mediante la stessa modalità di incubazione con digitonina (Dig) 1.25% vengono isolati complessi di minore entità e si mantiene la presenza delle tipiche isoforme monomeriche della proteina OPA 1.

La figura 20 mostra il diverso potere di solubilizzazione dei vari detergenti testati. I mitocondri da cuore in condizioni normossiche presentano fisiologicamente complessi della proteina OPA 1 a peso molecolare nettamente superiore a quelli evidenziati mediante la metodica SDS-PAGE. Tuttavia è possibile osservare, nel pannello B della figura, che nei mitocondri da cuore sottoposto a perfusione con H_2O_2 la proteina OPA 1 tende a formare spontaneamente aggregati con un peso molecolare superiore ai 1000 KDa.

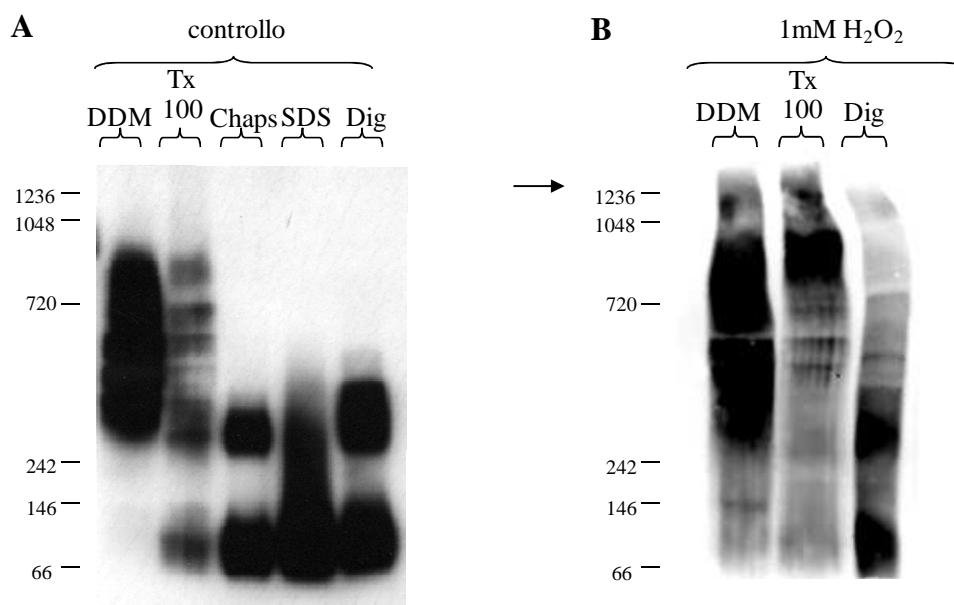


Figura 20. Elettroforesi nativa (Blue Native-PAGE) su campioni di cuore di ratto. I mitocondri estratti da un cuore di ratto in aerobiosi (A) e da un cuore di ratto sottoposto a riperfusione per 15 minuti con H_2O_2 1mM (B) sono stati trattati con i detergenti DDM, Triton X-100 e digitonina al fine di effettuare la solubilizzazione delle proteine transmembrana. I mitocondri da cuore di controllo sono stati trattati anche con Chaps ed SDS. Le proteine estratte sono state sottoposte a corsa elettroforetica su gel nativo in modo da isolare anche i complessi proteici a peso molecolare elevato. Dall'immunoblot emerge che nei mitocondri estratti da cuore trattato con H_2O_2 sono presenti degli aggregati proteici ad un peso molecolare superiore ai 1048 KDa (\rightarrow); tali complessi non sono presenti nei mitocondri estratti dal cuore di ratto non sottoposto a stress ossidativo.

Sottoponendo i campioni di mitocondri ad una seconda corsa elettroforetica è possibile migliorare la risoluzione della separazione in quanto si ha l'aggiunta nel tampone di corsa del detergente DDM in percentuale pari allo 0.02%.

Le figure 21A e 21B mostrano la presenza in ambedue i campioni utilizzati delle forme monomeriche di OPA 1 e di complessi con un peso molecolare superiore ai 250 KDa.

Tuttavia nei mitocondri isolati in condizioni di forte stress ossidativo (cuore riperfuso con H_2O_2) la dimensione degli aggregati che si formano è maggiore. La corsa elettroforetica in seconda dimensione è stata effettuata anche a partire dai campioni solubilizzati in presenza di DDM, detergente che isola gli aggregati di dimensione maggiore. Tuttavia nell'immunoblotting anti-OPA 1 le bande dei complessi non risultano ben definite (dato non mostrato).

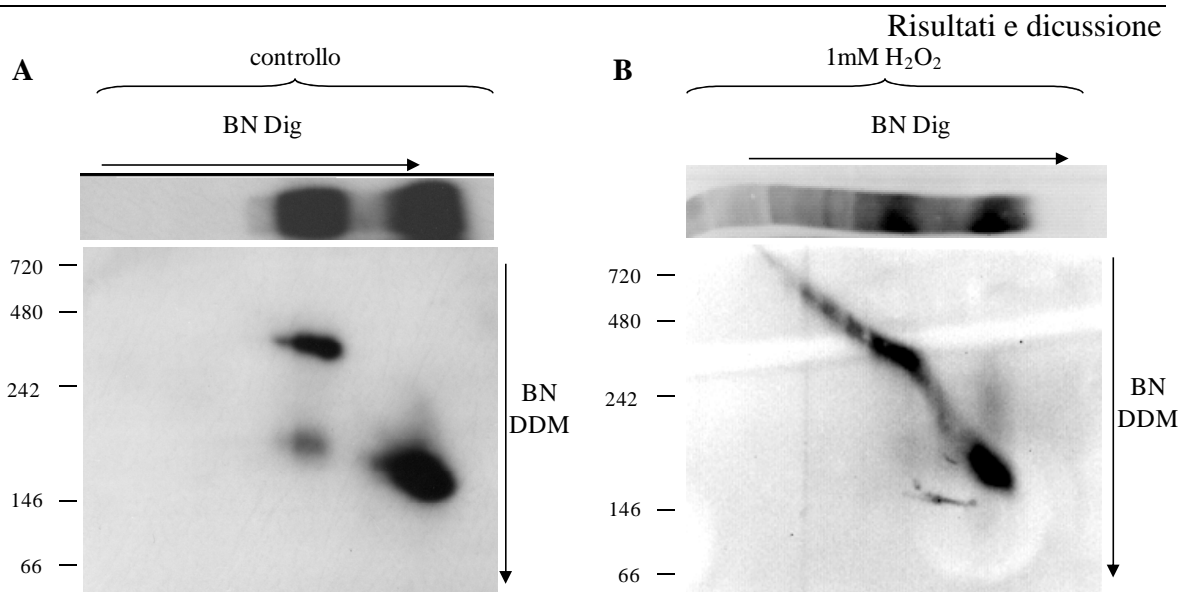


Figura 21. Elettroforesi bidimensionale nativa (Blue Native-PAGE) su campioni di cuore di ratto. Per permettere una migliore separazione dei complessi proteici evidenziati in figura W, è stata effettuata una seconda corsa elettroforetica in condizioni native in presenza di 4% DDM, in modo da agevolare ulteriormente la solubilizzazione dei complessi separati durante la prima corsa elettroforetica. La figura mostra l'immunoblotting anti-OPA 1 della seconda dimensione a partire dalle strisce di gel su cui sono state separate le proteine mitocondriali estratte da cuore di ratto in aerobiosi (A) e da cuore di ratto sottoposto a ri-perfusione per 15 minuti con H_2O_2 1mM (B) trattate con digitonina, che solubilizza gli aggregati proteici a peso molecolare maggiore. L'analisi evidenzia che in ambedue i campioni proteici sono presenti aggregati a peso molecolare di ~150 e ~300 KDa in condizioni native. Tuttavia i mitocondri estratti dal cuore sottoposto a stress ossidativo contengono aggregati della proteina OPA 1 a peso molecolare superiore ai 480 KDa.

5.2 Identificazione di complessi proteici di OPA 1 nella linea cellulare HL-1 e variazione della dinamica mitocondriale in seguito a stress ossidativo

Dopo aver dimostrato con diverse metodiche l'effetto dello stress ossidativo sulla proteina OPA 1, è risultato interessante capire quale fosse la conseguenza della formazione di aggregati aspecifici della proteina. Ad oggi il principale processo nei quali risulta coinvolta OPA 1 è il meccanismo di fusione e fissione mitocondriale (Olichon et al., 2007).

Con lo scopo di stabilire un eventuale coinvolgimento degli aggregati di OPA 1 nei processi di fissione e fusione mitocondriale è stata utilizzata la linea cellulare HL-1, cellule in coltura stabilizzata derivanti da atrio di ratto. Le cellule HL-1 poste in coltura sono state sottoposte ad incubazione con H_2O_2 quale agente ossidante, per confermare mediante analisi Western Blotting e rivelazione con l'anticorpo anti-OPA 1 la formazione di aggregati ad alto peso molecolare anche in questo modello *in vitro*. La figura 22 evidenzia la formazione degli aggregati di OPA 1; tale aggregazione proteica è invece assente nei lisati provenienti da cellule di controllo non incubate con H_2O_2 . Per determinare la natura del legame implicato nella formazione dei complessi di OPA 1, i campioni di lisati proteici sono stati esposti a condizioni riducenti mediante incubazione con β -mercaptoetanololo e, in seguito al trattamento, si è osservata la disgregazione di tali complessi.

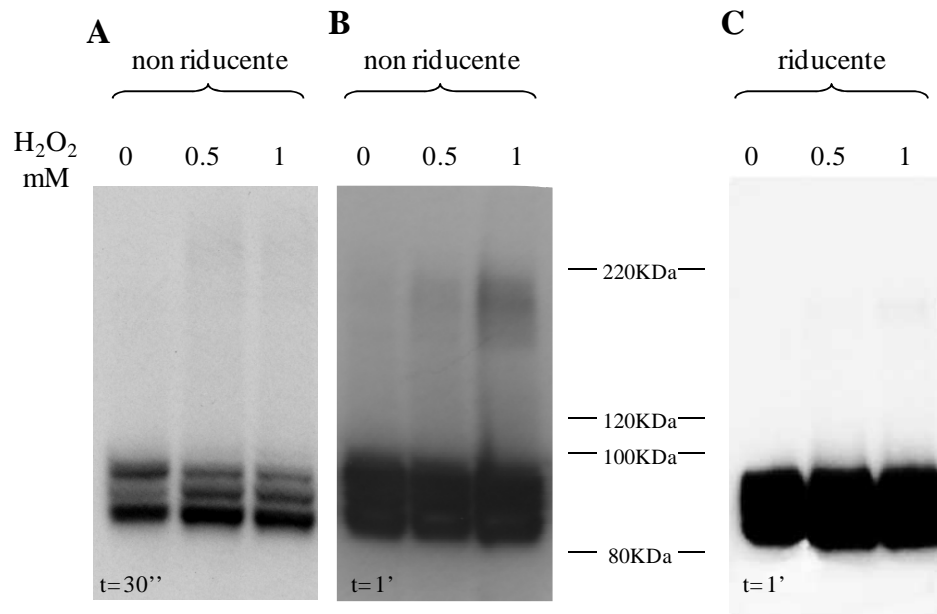


Figura 22. Formazione di complessi proteici ad alto peso molecolare di OPA 1 nelle HL-1 incubate con perossido di idrogeno e disgregazione di tali complessi in condizioni riducenti. Campioni di lisati proteici ottenuti in seguito ad incubazione di HL-1 per 30 minuti a 37°C con una soluzione di tampone HBS addizionato con 0.5 e 1mM H₂O₂ o con tampone HBS come controllo (0 mM H₂O₂). I campioni proteici sono stati denaturati secondo il metodo di Laemmli in assenza (condizione non riducente) o in presenza di β-mercaptoetanolo (condizione riducente). L'immunoblot acquisito ad un tempo di acquisizione maggiore (t=1') evidenzia la formazione di aggregati ad alto peso molecolare della proteina OPA 1 nel campione di cellule incubate con H₂O₂ in condizioni non riducenti (B). Tali aggregati non sono presenti nel controllo (0 mM H₂O₂) e nei campioni trattati con β-mercaptoetanolo (C).

Come osservato nel cuore di ratto, anche nelle cellule cardiache HL-1 è possibile affermare che i complessi ad alto peso molecolare della proteina siano dovuti alla formazione di ponti disolfuro tra residui di cisteina.

Le cellule HL-1 sono state poste in coltura e fatte aderire a vetrini portaoggetto sterili.

Dopo aver raggiunto un livello di confluenza pari al 90-95% le cellule sono state transfettate mediante lipofectamina con un plasmide contenente il gene codificante per la proteina fluorescente *Red Fluorescent Protein* (RFP) avente una sequenza di localizzazione mitocondriale. Il costrutto è denominato *MitoRed* (vedi sez. Materiali e metodi). In questo modo è stato possibile evidenziare mediante microscopia confocale le variazioni nella morfologia mitocondriale in risposta a stress ossidativo indotto da concentrazioni crescenti di H₂O₂. In particolare sono state acquisite una serie di immagini ad intervalli di 30 secondi per 30 minuti totali per ogni vetrino. In ogni esperimento eseguito è stata aggiunta una concentrazione crescente di H₂O₂ dopo cinque minuti dall'inizio dell'esposizione. Il controllo è rappresentato da cellule trasfettate non incubate con perossido di idrogeno.

Dalle immagini esemplificative riportate nella figura 23, è possibile osservare che nel vetrino di controllo si ha il movimento della rete mitocondriale che mantiene una struttura tubulare filamentosa. Al contrario, nelle cellule incubate con H₂O₂, si assiste alla disgregazione della rete mitocondriale e quindi ad un'aumentata fissione dei mitocondri.

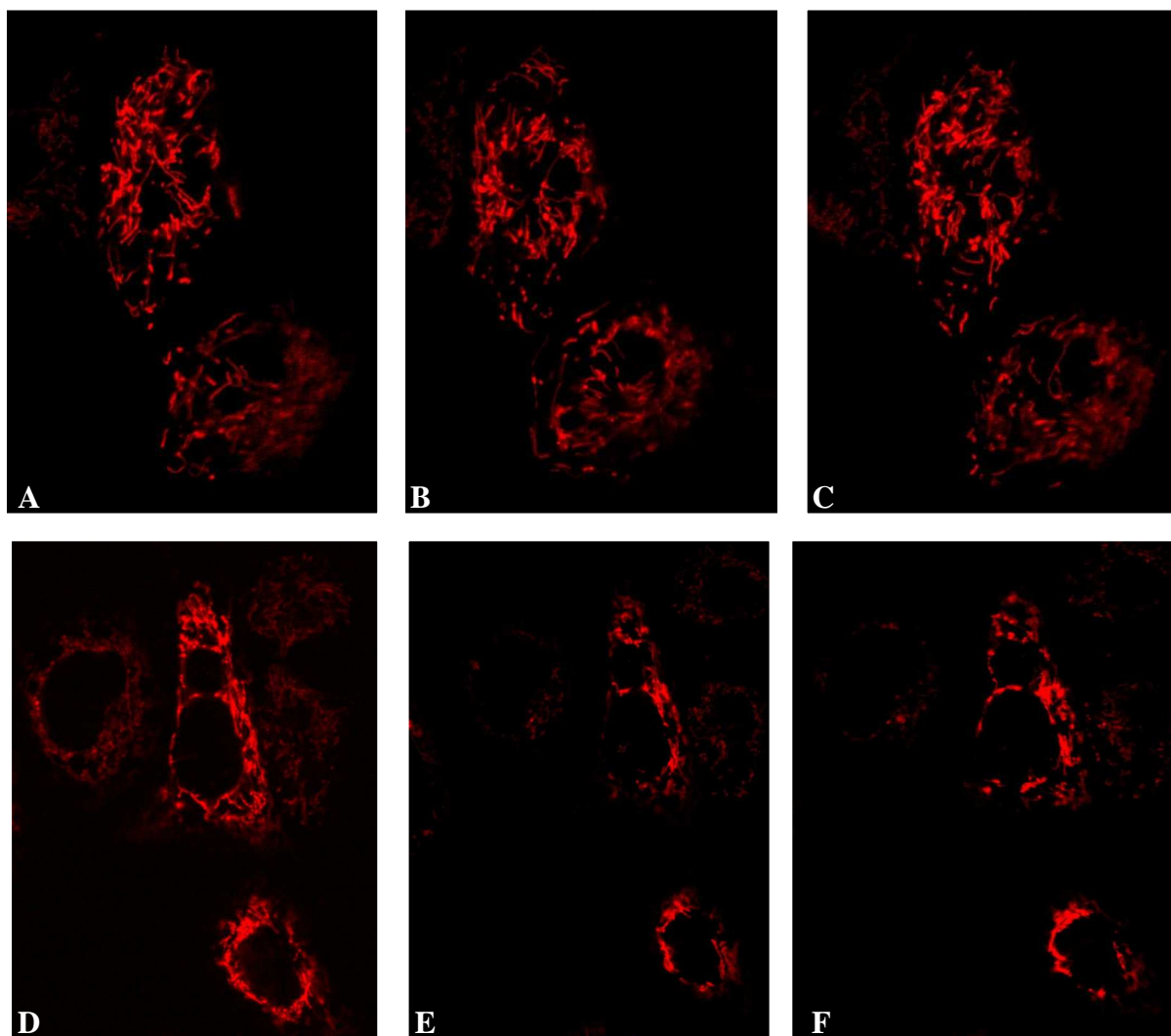


Figura 23. Variazione della dinamica mitocondriale in cellule HL1 in seguito ad incubazione con H_2O_2 . Cellule HL-1 transfettate con il marcatore mitocondriale fluorescente MitoRed sono state osservate per circa 30 minuti, ad intervalli di 30 secondi mediante microscopia confocale. Le immagini sono state acquisite in cellule mantenute in tampone HBS privo di H_2O_2 ed in cellule incubate, dopo 5 minuti dalla prima acquisizione, con una concentrazione di H_2O_2 pari a 1mM. La figura riporta le immagini relative a 0', 5' e 30' di cellule mantenute in tampone HBS (A-B-C) e di cellule incubate con 1mM H_2O_2 (D-E-F) dopo i primi 5 minuti. Le cellule sottoposte a stress ossidativo (D-E-F) mostrano una disgregazione della rete mitocondriale della cellula pochi secondi dopo l'incubazione con H_2O_2 . Nelle figure A-B-C è evidente uno spostamento della rete mitocondriale, ma la morfologia tubulare dei filamenti viene mantenuta anche dopo 30 minuti.

Studi recenti (Frezza et al., 2006) hanno messo in evidenza un nuovo ruolo della proteina OPA 1 relativo al controllo del rilascio dalla membrana interna mitocondriale di citocromo c, fattore chiave della via intrinseca di apoptosi.

In collaborazione con il gruppo del prof. Luca Scorrano dell' Istituto Veneto di Medicina Molecolare (VIMM) di Padova, è stato valutato il rilascio di citocromo c in mitocondri isolati ed incubati con le soluzioni ossidanti Fenton A e Fenton B sopra descritte, contenenti 1 mM H_2O_2 .

In seguito al trattamento i mitocondri sono stati centrifugati in modo da separare il sovranatante, contenente la frazione citosolica dei mitocondri danneggiati e le proteine rilasciate da essi, ed il precipitato, contenente i mitocondri integri e le membrane mitocondriali. La valutazione quantitativa del rilascio di citocromo c è stata effettuata mediante test ELISA (vedi sez. Materiali e metodi).

L'istogramma (figura 24) mostra la percentuale di citocromo c rilasciato dai mitocondri rispetto al citocromo c totale, dato dalla somma della proteina presente nel sovrinatante e nel pellet mitocondriale. I mitocondri non trattati con le soluzioni ossidanti hanno un rilascio di citocromo c pari al 6%, dovuto probabilmente ad una piccola percentuale di mitocondri danneggiati durante la procedura di estrazione. La percentuale di rilascio del fattore pro-apoptotico è nettamente superiore nei campioni trattati con le reazioni ossidanti Fenton A e Fenton B, ad indicare una maggiore attivazione della via apoptotica in seguito a stress ossidativo indotto *in vitro*. Secondo quanto da noi ipotizzato, la soluzione Fenton B, rappresentando la condizione di maggiore stress ossidativo rispetto alla soluzione Fenton A, dovrebbe determinare una maggiore fuoriuscita di citocromo c. Tuttavia è probabile che la presenza di sodio azide all'interno della soluzione Fenton B abbia interferito con il saggio colorimetrico del kit ELISA commerciale utilizzato, in quanto tale sostanza è un inibitore irreversibile della perossidasi (HRP).

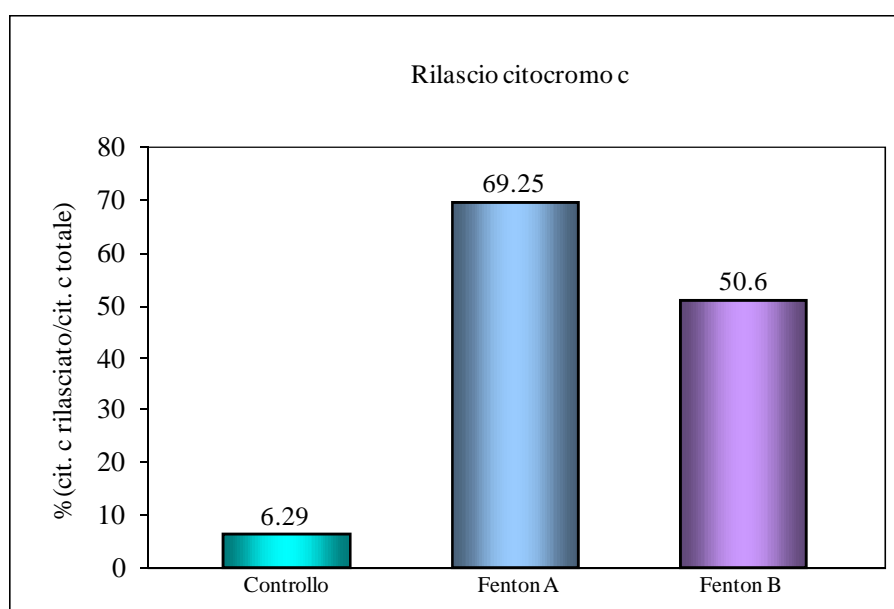


Figura 24. Percentuale di rilascio del citocromo c in seguito a trattamento con soluzioni ossidanti effettuato su mitocondri estratti da cuore di ratto. I mitocondri di cuore di ratto sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente con le soluzioni ossidanti Fenton A e Fenton B descritte in figura 15, contenenti 2mM H₂O₂. In seguito a centrifugazione a 10000g per 10' è stato valutato il quantitativo di citocromo c presente nel pellet, costituito dai mitocondri integri e da frammenti di membrana mitocondriale, rispetto al sovrinatante, contenente la frazione citosolica dei mitocondri danneggiati, mediante test ELISA. L'istogramma rappresenta il valore in % di citocromo c rilasciata dai mitocondri estratti da cuore di ratto rispetto citocromo c totale (presente nel pellet e nel sovrinatante). I mitocondri non trattati (controllo) hanno rilasciato un quantitativo minimo di proteina antiapoptotica rispetto ai mitocondri sottoposti a stress ossidativo.

I dati ottenuti hanno confermato la relazione tra aggregazione della proteina mitocondriale e stress ossidativo *in vitro* anche nella linea cellulare cardiaca HL-1. La scelta di questo modello sperimentale ha permesso di svolgere uno studio di funzionalità della proteina OPA 1 sia a livello del processo di fusione mitocondriale, sia, indirettamente, a livello di rimodellamento delle *cristae* mitocondriali interne, valutando il rilascio del fattore proapoptotico, citocromo c, in esse contenuto.

5.3 Identificazione di complessi proteici di OPA 1 nella linea cellulare MEF

La proteina OPA 1 è ubiquitariamente espressa nei mitocondri di tutte le cellule ed è quindi presente anche nella linea cellulare di fibroblasti murini (Mouse Embryonic Fibroblast, MEF). Le cellule MEF, definite wild type (MEF WT), esprimono tutte le isoforme della proteina OPA 1 e possiedono una rete mitocondriale tubulare ed allungata, simile a quella osservata nella linea HL-1.

Presso il laboratorio del Prof. Scorrano (VIMM), era già disponibile questa linea cellulare modello silenziata per il gene *Opa 1* mediante RNA interference (MEF OPA 1^{-/-}), che è caratterizzata da mitocondri frammentati e puntiformi dovuti al blocco del processo di fusione mitocondriale. La linea MEF WT è stata sottoposta ad incubazione con perossido di idrogeno, quale agente ossidante, per verificare l'eventuale formazione di aggregati ad alto peso molecolare della proteina OPA 1. L'analisi è stata condotta mediante Western Blotting e successiva rivelazione con l'anticorpo anti-OPA 1 a partire dai lisati proteici totali. La figura 25 evidenzia che nelle cellule MEF WT incubate con H₂O₂ sono evidenti bande ad alto peso molecolare, indicanti la formazione di complessi di OPA 1.

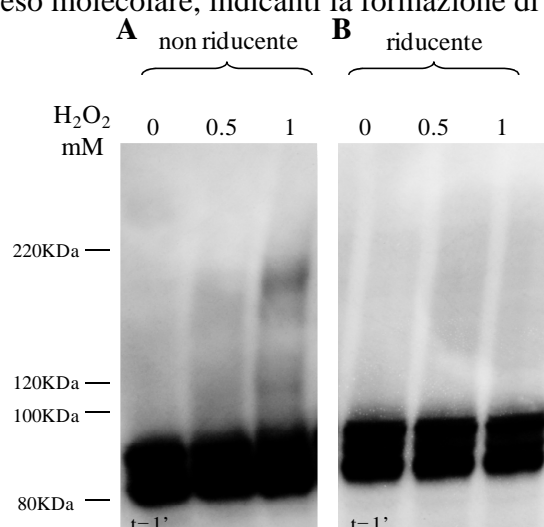


Figura 25. Formazione di complessi proteici ad alto peso molecolare di OPA 1 in cellule MEF incubate con perossido di idrogeno e disgregazione di tali complessi in condizioni riducenti. Campioni di lisati proteici ottenuti in seguito ad incubazione di MEF per 30 minuti a 37°C con una soluzione di tampone HBS addizionato con 0.5 e 1mM H₂O₂ o con tampone HBS come controllo (0 mM H₂O₂). I campioni proteici sono stati denaturati secondo il metodo di Laemmli in assenza (condizione non riducente) o in presenza di β-mercaptoetanolo (condizione riducente). L'immunoblot evidenzia la formazione di aggregati ad alto peso molecolare della proteina OPA 1 nel campione di cellule incubate con H₂O₂ in condizioni non riducenti (A). Tali aggregati non sono presenti nel controllo (0 mM H₂O₂) e nei campioni trattati con β-mercaptoetanolo (B).

La scelta dell'utilizzo di questo modello cellulare di derivazione epiteliale e non cardiaca è stata dettata dalla disponibilità di cellule *Opa 1*^{-/-} in cui poter esprimere la proteina mutata in specifici residui amminoacidici.

5.4 Identificazione di ipotetici residui cisteinici coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intermolecolari

Data l'evidenza riguardante la disgregazione dei complessi proteici di OPA 1 nel cuore isolato in seguito a trattamento con l'agente riducente β -mercaptoetanololo (vedi figura 17), è stato ipotizzato che tali complessi fossero dovuti alla formazione di ponti disolfuro tra residui di cisteina.

Sono state inizialmente allineate tutte le varianti di *splicing* note della proteina, mediante il programma *CLUSTALW* disponibile nel sito <http://expasy.org/tools/>. Tutte le varianti di OPA 1 contengono dieci residui cisteinici conservati.

Dal momento che la struttura della proteina OPA 1 non è stata risolta né mediante NMR né mediante cristallografia a raggi-X, è stata effettuata una predizione di struttura della proteina mediante *homology modelling* per individuare le cisteine coinvolte nella formazione dei ponti disolfuro. Tale analisi è stata eseguita in collaborazione con il laboratorio del Prof. S. Moro (Università degli Studi di Padova).

La tecnica di *homology modelling* consiste nell'effettuare un allineamento di sequenza tra la proteina *target*, nel nostro caso OPA 1, e proteine la cui struttura è stata sperimentalmente determinata (*template*). Le proteine *template* utilizzate sono proteine appartenenti alla famiglia delle dinamine, quali dinamina, mitofusine o GBPs (guanylate binding proteins). La costruzione del modello viene calcolata mediando la posizione di ciascun atomo nella sequenza del *target* rispetto alla posizione dell'atomo corrispondente nel *template*. Il relativo contributo di ciascuna struttura è determinato dal grado locale di omologia con la sequenza *target*. Dall'allineamento di sequenza tra i singoli sottodomini proteici di OPA 1 è emerso che vi è una bassa percentuale di similarità di sequenza (16-30%) con i relativi *template* (figura 26B). Per questo motivo la predizione della struttura secondaria e terziaria della proteina OPA 1 (figura 26A) dà luogo ad un modello non completamente attendibile (*high risk model*).

Tuttavia questo rappresenta il migliore modello strutturale attualmente disponibile per la proteina OPA 1. Dall'ipotesi relativa ad una possibile dimerizzazione della proteina è emerso che i residui cisteinici più probabilmente coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intermolecolari tra due proteine OPA 1 sono le cisteine localizzate a livello del *pleckstrin homology domain* (PHD).

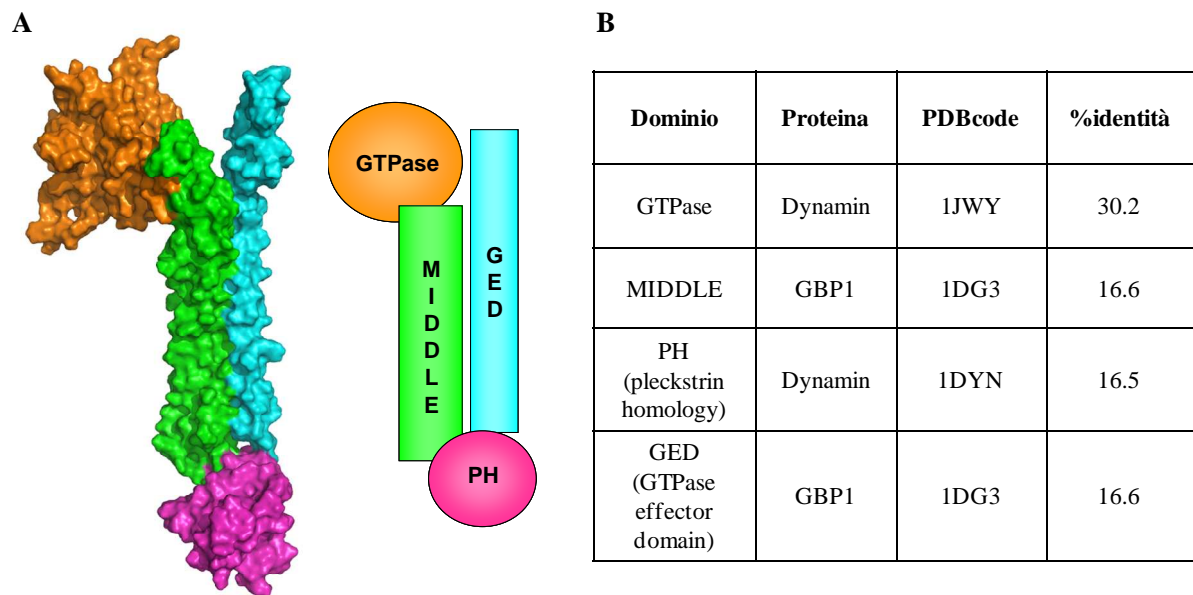


Figura 26. Homology modelling della proteina OPA 1. (A) Rappresentazione tridimensionale e schematica della struttura di OPA 1. La tabella (B) riporta la percentuale di identità tra la sequenza primaria di OPA 1 e di altre proteine appartenenti alla famiglia delle dinamine.

Questo dominio proteico possiede una struttura secondaria ad α -elica dalla quale risulterebbero esposte le catene laterali dei residui cisteinici 853 e 874 (figura 27).

All'interno del dominio coiled coil predetto sono però contenuti almeno tre residui cisteinici: cisteina 853, cisteina 856 e cisteina 874. Questi residui sono quindi stati scelti per la realizzazione di mutanti dell'isoforma 1 umana della proteina OPA 1.

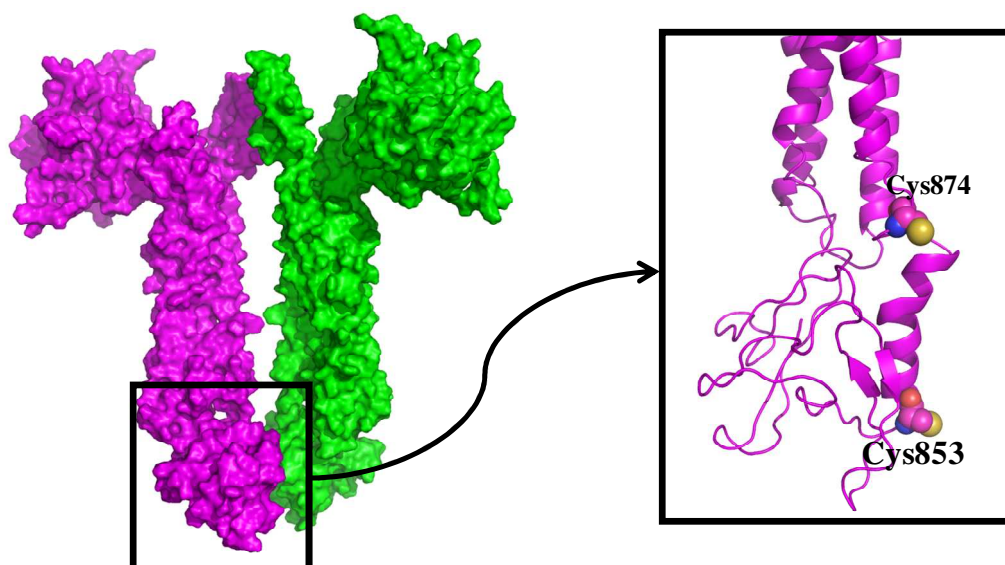


Figura 27. Ipotesi di dimerizzazione della proteina OPA 1 e individuazione degli ipotetici residui cisteinici coinvolti.

5.5 Progettazione di mutanti a livello di residui cisteinici della proteina OPA 1

La strategia utilizzata per la progettazione dei mutanti nei residui cisteinici predetti è una mutagenesi di tipo “sito diretto”. Le mutazioni da cisteina a serina nella sequenza aminoacidica della proteina Opa 1 sono state ottenute mediante PCR sul plasmide pMSCV contenente la sequenza dell’isoforma 1 del gene *Opa 1* (gentilmente fornito dal laboratorio del Prof. Luca Scorrano (VIMM)), come descritto nella sez. Materiali e metodi.

Il DNA plasmidico utilizzato come *template* nelle reazioni di PCR è stato inizialmente preparato mediante amplificazione su larga scala in *E. Coli* (vedi Materiali e metodi). Il plasmide è stato digerito con l’enzima di restrizione Age I, generando due frammenti di circa 8500bp e 1500bp (figura 28). Per evitare la chiusura del plasmide dovuta alla complementarità delle estremità, è stata defosforilata l’estremità 5’ del filamento mediante trattamento con fosfatasi antartica.

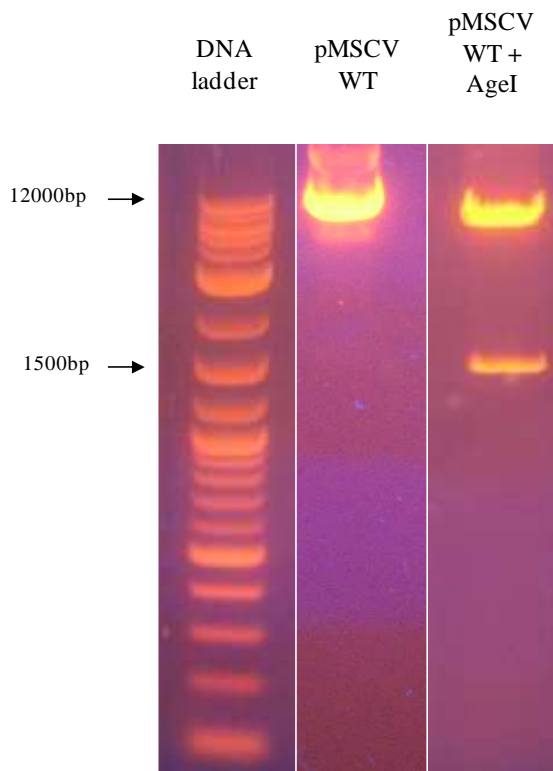


Figura 27. Amplificazione del plasmide pMSCV e digestione con AgeI. Elettroforesi di gel di agarosio all’1% del plasmide pMSCV amplificato su larga scala nel ceppo batterico DH10B di *E. Coli* (pMSCV WT). Nell’ultima lane sono mostrati i frammenti di 8500bp e 1500bp generati dalla digestione del plasmide con l’enzima di restrizione AgeI (pMSCV WT+AgeI).

Lo stesso enzima Age I è stato utilizzato per la digestione dei frammenti contenenti la mutazione sito specifica. Per la creazione dei mutanti mediante PCR, sono stati utilizzati primers contenenti il nucleotide mutato (vedi Materiali e metodi), che hanno permesso l’amplificazione dei frammenti d’interesse (figura 29).

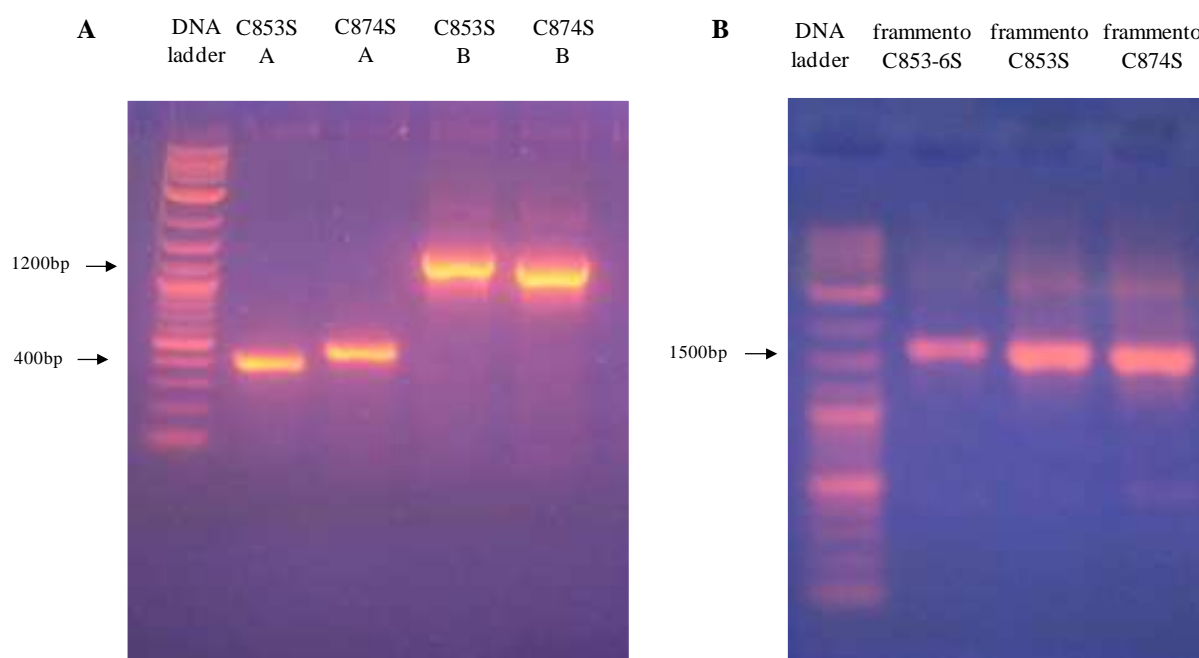


Figura 29. Formazione di frammenti mutanti a livello cisteinico del gene *Opa 1*. Mediante PCR, a partire dal plasmide pMSCV contenente il gene per l'isoforma 1 di OPA 1, sono stati amplificati i frammenti mutagenizzati nei residui cisteinici. (A) Utilizzando i primer descritti in tabella 2 sono stati amplificati la prima parte del frammento mutato in cisteina 853 (C853S A) avente una dimensione pari a 391bp e la seconda parte del medesimo frammento (C853S B) di 1173bp. Il frammento Mut C874S A di 453 rappresenta la migrazione della prima parte del frammento, mentre nell'ultima lane è presente la seconda parte dello stesso frammento (C874S B) di 1111bp. (B) Migrazione su gel di agarosio dei frammenti mutati completi: frammento C853-6S, C853S, C874S con dimensione pari a 1564bp ciascuno.

In seguito a ligazione dei frammenti mutati all'interno del plasmide pMSCV, sono stati trasformati batteri appartenenti al ceppo DH10B ed è stato effettuato uno screening delle colonie positive alla selezione in ampicillina. Dalle colonie batteriche selezionate, è stato estratto il plasmide contenente la doppia mutazione cisteina 853-6.

Nonostante la variazione di vari parametri sperimentali relativi alle condizioni di ligazione, non sono stati ottenuti i due cloni contenenti rispettivamente la mutazione a carico della cisteina 874 e della cisteina 853.

Si è quindi scelto di modificare la strategia di ottenimento dei plasmidi mutati, utilizzando il kit commerciale Quick Change® II Site-Directed Mutagenesis (descritto nel paragrafo 4.13). La mutagenesi avviene mediante amplificazione diretta, da parte di una DNA polimerasi ad alta efficienza, dell'intero plasmide di partenza pMSCV a partire da un primer contenente la mutazione d'interesse.

In questo modo sono stati ottenuti i due plasmidi pMSCV mutati a livello delle triplette nucleotidiche codificanti per le cisteine 853 e 874 della proteina OPA 1 mediante singola reazione di PCR. La verifica dell'avvenuta inserzione del frammento mutagenizzato è stata eseguita sia mediante digestione del plasmide estratto con l'enzima *AgeI* (figura 30), sia mediante sequenziamento eseguito presso BMR Genomics (figura 31).

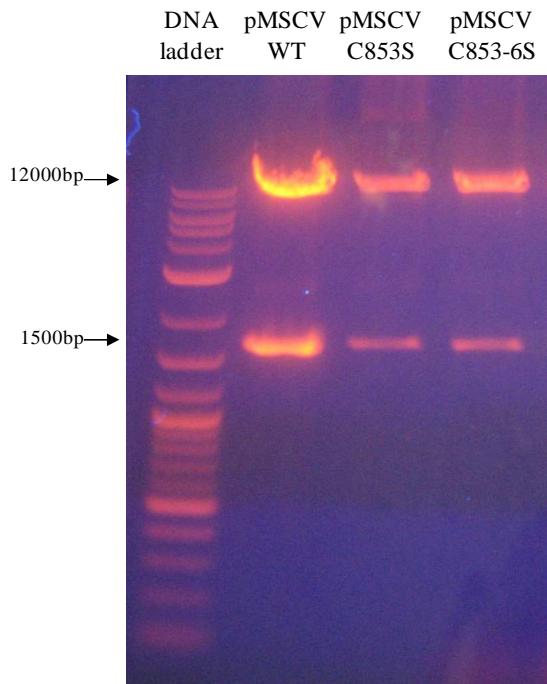


Figura 30. Verifica dell'inserzione dei frammenti mutati nel plasmide pMSCV mediante digestione con AgeI. Elettroforesi di gel di agarosio all'1% del plasmide pMSCV in seguito a digestione con AgeI (pMSCV WT). In pMSCV C853S e pMSCV C853-6S sono mostrati i frammenti generati dalla digestione del plasmide contenente i frammenti mutati rispettivamente nei residui cisteinici 853 ed 853-6 con l'enzima di restrizione AgeI.

Il sequenziamento dei plasmidi ottenuti è stato necessario non solo per constatare l'avvenuta mutazione all'interno della tripletta nucleotidica d'interesse, ma anche per verificare la non inserzione di mutazioni puntiformi secondarie aspecifiche.

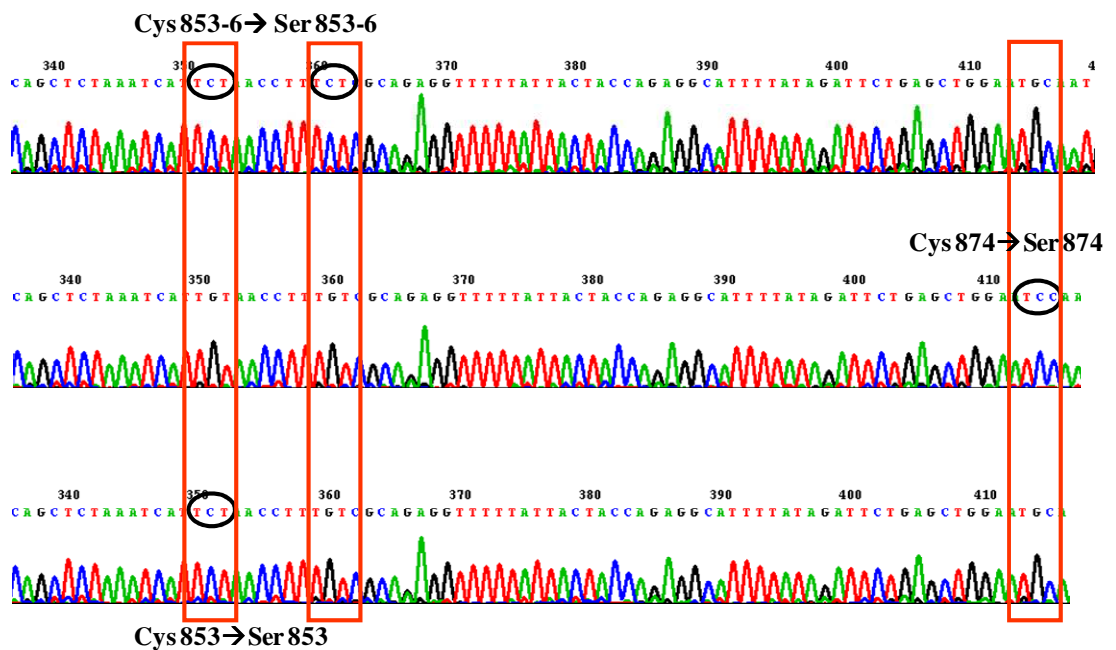


Figura 31. Allineamento delle sequenze codificanti per il gene *OPA1* dei mutanti in C853-6S, C874S e C853S.

5.6 Generazione di cloni stabili esprimenti la proteina OPA 1 mutata

Utilizzando due diverse metodologie di mutagenesi di tipo sito diretta, precedentemente descritte nei paragrafi 3.10 e 3.11, sono stati ottenuti i plasmidi denominati pMSCV C853S, pMSCV C874S e pMSCV C853-6S.

Tali costrutti genici contengono rispettivamente la mutazione a livello delle triplette nucleotidiche codificanti per le cisteine 853, 874 e 853-6 della sequenza primaria della proteina OPA 1. Cellule HEK 293 sono state utilizzate quali cellule di packaging per la produzione di vettori lentivirali. Sono stati generati cloni cellulari esprimenti in modo stabile la proteina mutata in cellule MEF OPA 1^{-/-}, utilizzando puromicina quale agente di selezione. In seguito alla selezione con l'antibiotico, sono stati ottenuti soltanto i cloni cellulari transdotti con i plasmide pMSCV C853-6S e pMSCV C853S, perdendo quindi la caratterizzazione della mutazione a livello della cisteina 874. Inoltre sono state selezionate cellule trasfettate con plasmide pMSCV non contenente frammento genico codificante OPA 1 (pMSCV Empty), quale controllo negativo della trasfezione, e con il plasmide pMSCV contenente il gene codificante per l'isoforma 1 di OPA 1 non mutagenizzato (pMSCV WT) (figura 32).

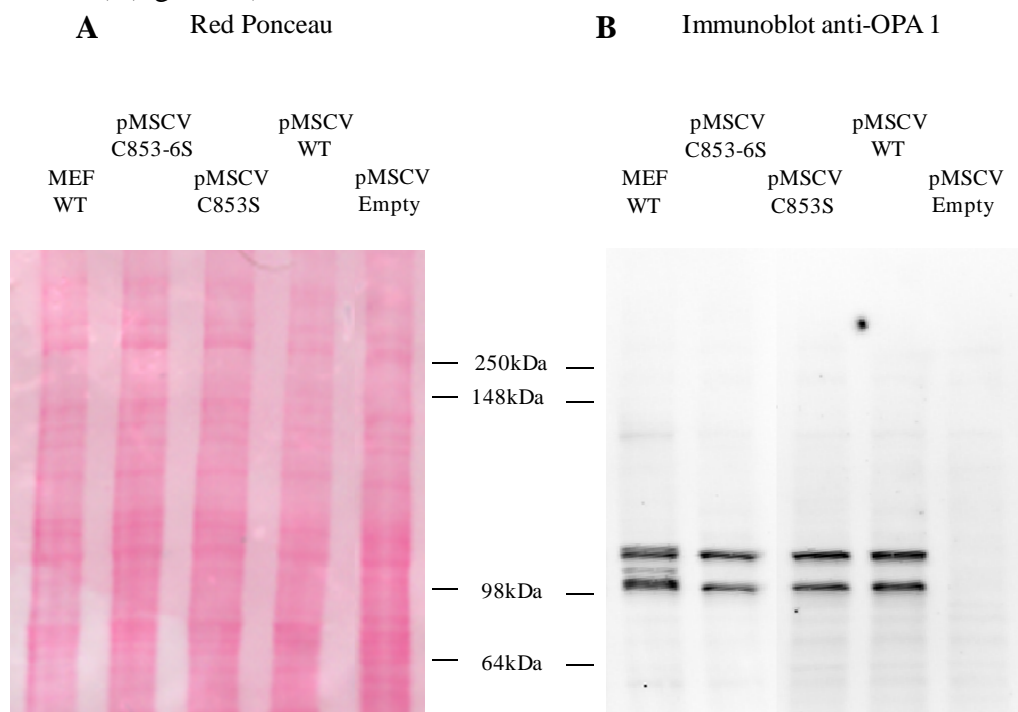


Figura 32. Espressione della proteina OPA 1 in cellule MEF OPA 1^{-/-} trasfettate stabilmente con il plasmide pMSCV mutato. Campioni di lisati proteici di cloni cellulari ottenuti trasfettando MEF OPA 1^{-/-} con il plasmide pMSCV C853-6S (lane 2), pMSCV C853S (lane 3), pMSCV WT (lane 4) e pMSCV Empty (lane 5). La lane 1 riporta i lisati proteici della linea cellulare MEF WT, utilizzata come controllo positivo. L'immunoblot evidenzia la presenza della proteina nel campione di controllo (lane 1) e nelle cellule trasfettate con i plasmidi contenenti il frammento genico codificante per OPA 1 (lane 2, 3,4), mentre nelle cellule trasfettate con il plasmide privo di tale frammento (pMSCV Empty), la proteina non viene espressa (lane 5).

5.7 Analisi della morfologia mitocondriale nei cloni cellulari ottenuti in seguito a trasfezione virale

La morfologia mitocondriale è stata analizzata nei cloni cellulari esprimenti l'isoforma 1 di OPA 1 non mutata (pMSCV WT), l'isoforma 1 mutata a livello delle cisteine 853-6 (pMSCV C853-6S) e 853 (pMSCV C853S) e di cloni privi del frammento genico di tale proteina (pMSCV Empty). L'analisi è stata eseguita mediante microscopia ad epifluorescenza, paragonando il fenotipo mitocondriale di tali cloni cellulari con quello di cellule di controllo, quali: la linea cellulare di fibroblasti murini MEF WT e la linea silenziata per la proteina di interesse (MEF OPA 1^{-/-}) (figura 33).

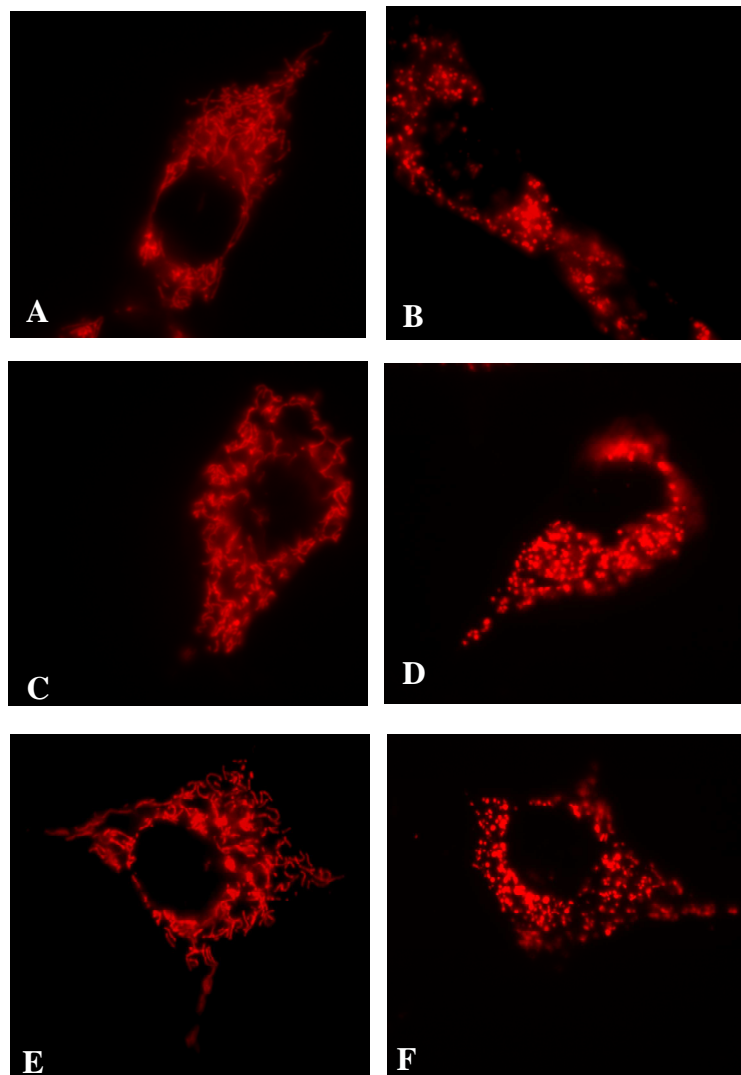


Figura 33. Osservazione della morfologia mitocondriale in cellule MEF. Cellule MEF WT (A), MEF OPA 1^{-/-} (B) e i cloni ottenuti dalla trasfezione stabile di MEF OPA 1^{-/-} con il plasmide pMSCV WT (C), pMSCV Empty (D), pMSCV C853S (E) e pMSCV C853-6S (F) sono state transfettate con il marcatore mitocondriale fluorescente MitoRed ed osservate in microscopia ad epifluorescenza. Le immagini sono state acquisite da cellule mantenute in tampone HBS. Le cellule MEF WT presentano mitocondri interconnessi e tubulari tipici del processo di fusione (A). Le MEF OPA 1^{-/-} sono caratterizzate da una rete mitocondriale frammentata e puntiforme (B). I cloni cellulari MEF pMSCV WT (C) mostrano interconnessione dei mitocondri che costituiscono filamenti allungati. I cloni ottenuti trasfettando MEF OPA 1^{-/-} con il plasmide privo del frammento codificante per OPA 1 (pMSCV Empty) presentano disgregazione della rete mitocondriale (D). Nei cloni esprimenti la proteina mutata a livello del residuo cisteinico 853 si osserva un ripristino delle caratteristiche morfologiche mitocondriali di fusione (E). Le cellule esprimenti la proteina mutata a livello dei residui cisteinici (pMSCV C853-6S, F) sono caratterizzate da mitocondri puntiformi e isolati.

Cellule fatte aderire a vetrini portaoggetto sono state trasfettate mediante lipofectamina con un plasmide contenente il gene codificante per la proteina fluorescente RFP (*red fluorescent protein*) con una sequenza di localizzazione mitocondriale (vedi sezione Materiali e metodi). Le cellule di controllo MEF WT presentano mitocondri interconnessi in strutture tubulari allungate. I mitocondri delle cellule MEF che non esprimono la proteina OPA 1 si presentano isolati e organizzati in strutture puntiformi ad indicare il ruolo fondamentale della proteina OPA 1 nel processo di fusione mitocondriale.

Le cellule MEF OPA 1^{-/-} trasfettate con il plasmide pMSCV Empty rappresentano il controllo negativo della trasfezione, in quanto sottoposte a trasfezione con il vettore lentivirale, ma non esprimono la proteina. Tali cloni possiedono una rete mitocondriale frammentata similmente a quella osservata nelle MEF OPA 1^{-/-}. Mediante trasfezione con il plasmide pMSCV WT, l'isoforma 1 della proteina è stata nuovamente espressa ed i mitocondri si presentano allungati ed interconnessi, dimostrando che l'espressione della sola isoforma 1 della proteina è sufficiente per il ripristino della morfologia mitocondriale osservata nelle cellule WT. Le cellule MEF pMSCV WT sono indicative dell'esito positivo del processo di trasfezione.

I mitocondri osservati nei cloni trasfettati con il plasmide mutato pMSCV C853-6S sono puntiformi e privi di interconnessione. L'analisi indica che la mutazione dei due residui cisteinici provoca una perdita di funzionalità della proteina OPA 1 relativamente al processo di fusione mitocondriale. Al contrario, la singola mutazione a livello del residuo cisteinico 853 non blocca il processo di ripristino della rete mitocondriale, indicando come tale modifica non interferisca nella funzione fusogena della proteina.

5.8 Formazione dei complessi proteici di OPA 1 e variazione della dinamica mitocondriale in seguito a stress ossidativo nei cloni cellulari

La formazione degli aggregati proteici in seguito a stress ossidativo è stata verificata mediante analisi Western Blotting sia nella linea cellulare cardiaca HL-1 (figura 22), sia nella linea cellulare di fibroblasti MEF WT (figura 25). L'espressione della sola isoforma 1 della proteina nella linea cellulare MEF OPA1^{-/-} (pMSCV WT) è risultata essere sufficiente per l'induzione dell'aggregazione proteica (figura 34). I cloni cellulari ottenuti, in seguito a trasfezione lentivirale, sono stati quindi incubati con 1 mM H₂O₂, al fine di definire la capacità di formazione del complesso nella proteina mutata.

Dall'immunoblotting anti-OPA 1, riportato in figura 34A, si osserva che, a livello delle isoforme monomeriche della proteina, nelle cellule pMSCV WT l'incubazione con H_2O_2 induce un aumento di cleavage al sito S1 della proteina, in quanto si ha un aumento della banda a basso peso molecolare, corrispondente all'isoforma 1 priva della sequenza all'N-terminale della proteina. La stessa variazione si osserva in presenza della proteina mutata a livello della cisteina 853.

La doppia mutazione a livello dei residui cisteinici 853 e 856 mostra un incremento dell'isoforma non processata della proteina già in condizioni non ossidanti ed in presenza di H_2O_2 , si verifica degradazione di ambedue le isoforme monomeriche.

Dalla figura 34B è possibile osservare che nei cloni esprimenti la proteina non mutata (pMSCV WT), in condizioni ossidanti, si ha la formazione dello stesso complesso di OPA 1 presente nelle linee cellulari HL-1 e WT. In presenza della mutazione a carico del residuo cisteinico 853 o della doppia mutazione 853-6, l'aggregato proteico non viene rilevato, suggerendo l'inibizione della formazione di ponti disolfuro intermolecolari.

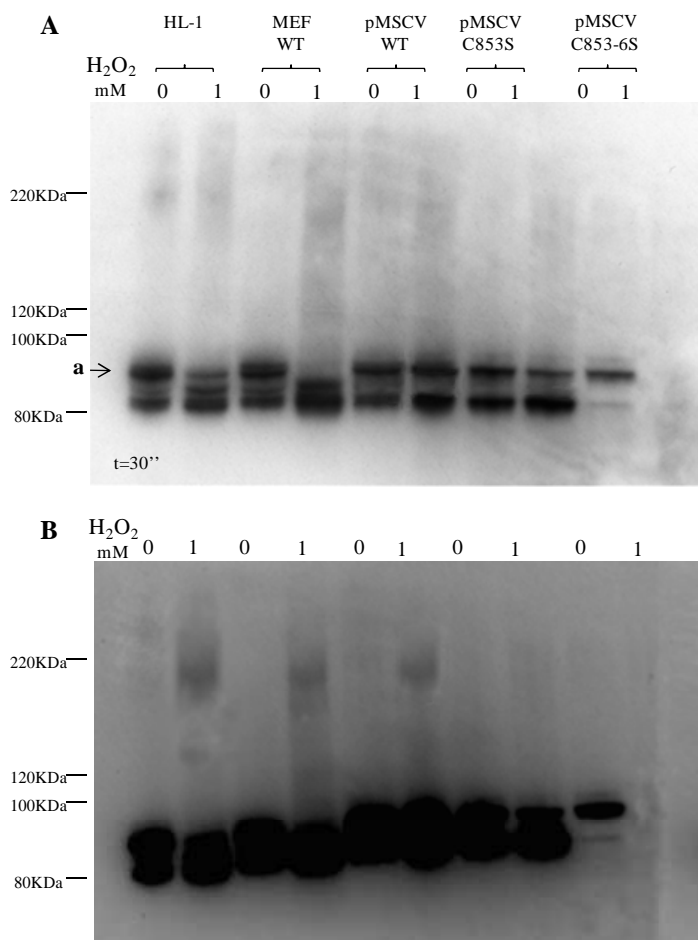


Figura 34. Formazione di complessi proteici ad alto peso molecolare di OPA 1 in seguito a trattamento con perossido di idrogeno nella linea cellulare MEF e nei cloni trasfettati. Campioni di lisati proteici ottenuti in seguito ad incubazione delle linee cellulari in tampone HBS addizionato con 1 mM H_2O_2 o in tampone HBS (come controllo) per 30 minuti a 37°C. I campioni proteici sono stati denaturati secondo il metodo di Laemmli in assenza di β -mercaptoetanolo (condizione riducente). (A) L'immunoblot evidenzia il clivaggio dell'isoforma lunga di OPA 1 (a) inseguito a trattamento con l'agente ossidante. (B) L'immunoblot acquisito ad un tempo di acquisizione maggiore ($t=1'$) evidenzia la formazione di aggregati ad alto peso molecolare della proteina OPA 1 nelle cellule MEF WT e nel clone trasfettato pMSCV WT. I cloni contenenti la proteina mutata a livello dei residui cisteinici 853 (pMSCV C853S) e 853-6 (pMSCV C853-6S) non presentano aggregazione della proteina OPA1 in seguito ad incubazione con l'agente ossidante.

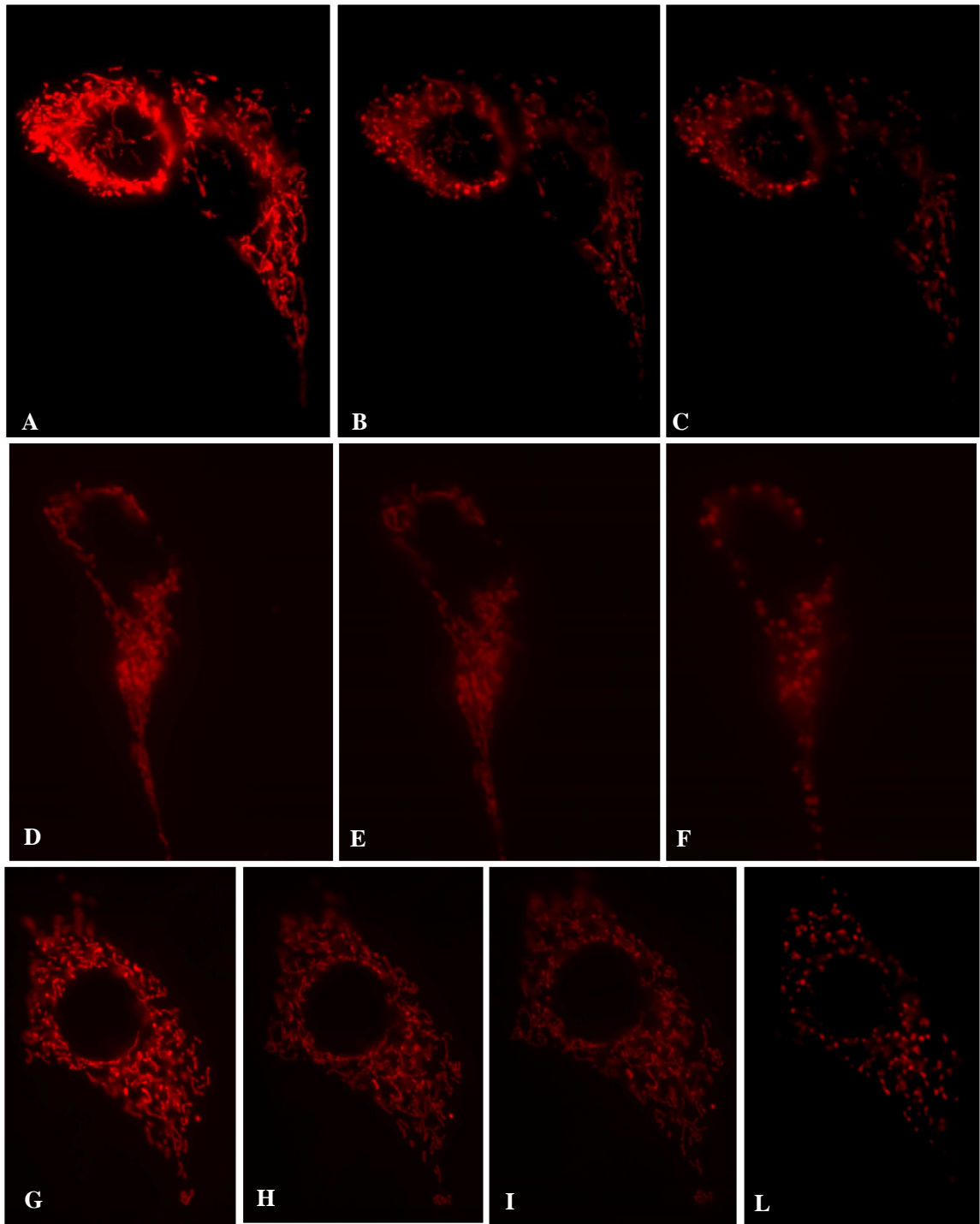


Figura 35. Variazione morfologica della rete mitocondriale in cellule MEF in seguito ad incubazione con H_2O_2 . Cellule MEF WT (A, B, C) ed i cloni ottenuti dalla trasfezione stabile di MEF OPA 1^{-/-} con il plasmide pMSCV WT (D, E, F) e pMSCV C853S (G, H, I) sono state transfettate con il marcatore mitocondriale fluorescente MitoRed ed osservate in microscopia ad epifluorescenza. Le immagini sono state acquisite in cellule mantenute in tampone HBSS-Na incubate con 1mM H_2O_2 . La figura riporta in sequenza le immagini relative a 0', 10' e 20' di incubazione. Le cellule MEF WT (A, B, C) mostrano una completa disgregazione della rete mitocondriale dopo 20' di incubazione. I cloni cellulari MEF pMSCV WT, in cui si verifica il ripristino del fenotipo di fusione mitocondriale, sono soggetti ad una tempistica di disgregazione della rete mitocondriale simile a quella evidenziata nella linea cellulare WT (D, E, F). Nei cloni esprimenti la proteina mutata a livello del residuo cisteinico 853 (pMSCV C853S) è evidente uno spostamento della rete mitocondriale, ma la morfologia tubulare dei filamenti viene mantenuta anche dopo 20' di esposizione all'agente ossidante (G, H, I); a 40' di incubazione si ha disgregazione della rete mitocondriale (L).

Ambedue i cloni cellulari sono stati trasfettati in modo transiente con il plasmide MitoRed, secondo il protocollo descritto in Materiali e metodi, in modo da poter eseguire un'analisi della dinamica mitocondriale in presenza di una concentrazione 1 mM di perossido di idrogeno.

Le immagini sono state acquisite ad intervalli di 30 secondi per un tempo totale di 30 minuti. L'agente ossidante è stato aggiunto al tampone HBS dopo 5 minuti dalla prima acquisizione.

Il pannello riportato in figura 35, riporta le immagini relative ad una tempistica di 0, 10, 20 minuti di incubazione nella linea cellulare MEF WT e nel clone esprime la proteina non mutata (pMSCV WT). Per il clone pMSCV C853S è riportata anche l'immagine relativa a 40 minuti di incubazione. In tutte le linee cellulari analizzate è osservabile una progressiva disgregazione della rete mitocondriale. Tuttavia nelle cellule esprimenti la proteina mutata in cisteina 853, la rottura della rete mitocondriale avviene con una tempistica rallentata. In particolare, i mitocondri appaiono completamente disgregati dopo circa 40 minuti di incubazione, suggerendo un significativo aumento della resistenza dei mitocondri al processo di fissione mitocondriale.

6 CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ha caratterizzato la relazione tra stress ossidativo e modificazioni della proteina mitocondriale OPA 1. Numerosi lavori in letteratura indicano che i mitocondri sono al tempo stesso sito di produzione e bersaglio delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Per questo il nostro studio si proponeva di valutare nel miocardio l'eventuale modificazione ossidativa della proteina OPA 1 localizzata a livello della membrana mitocondriale interna e coinvolta nei processi di fusione e fissione mitocondriali.

Sottoponendo il cuore di ratto *ex-vivo* a stress ossidativo mediante ischemia/riperfusionazione o mediante perfusione con H_2O_2 , responsabile di stress ossidativo massimale, OPA 1 forma aggregati ad alto peso molecolare.

Per convalidare l'ipotesi che l'aggregazione proteica avvenisse in risposta allo stress ossidativo, sezioni di tessuto derivanti da cuori di controllo sono state trattate *in vitro* con due diverse soluzioni ossidanti, contenenti una concentrazione crescente di perossido di idrogeno. La formazione degli aggregati proteici correla con il quantitativo di agente ossidante presente in soluzione. Il trattamento dei lisati proteici da tessuto con un agente riducente dimostra che la formazione dei complessi proteici è reversibile ed in particolare che il legame che si stabilisce tra le proteine è dovuto alla formazione di ponti disolfuro.

La proteina OPA 1 è coinvolta nel processo di fusione mitocondriale e rappresenta l'unica proteina presente a livello della membrana mitocondriale interna implicata nella modificazione della morfologia mitocondriale. Per analizzare la variazione della dinamica mitocondriale è stata utilizzata la linea cellulare murina di derivazione atriale (HL-1) ed una linea cellulare di fibroblasti murini embrionali (MEF). In ambedue le linee cellulari il trattamento con H_2O_2 induce la formazione di un complesso proteico di OPA 1 (in condizioni non riducenti) e, nelle stesse condizioni di ossidazione, si osserva la graduale rottura dei filamenti che costituiscono la rete mitocondriale ad indicare uno squilibrio tra i processi di fusione e fissione mitocondriali, a favore della fissione. L'induzione del processo di fissione mitocondriale in seguito a stress ossidativo è in linea con la risposta della dinamica mitocondriale a vari stimoli, quali la variazione del potenziale di membrana (Griparic et al., 2007; Song et al., 2007) e la deplezione di ATP e di ioni bivalenti (Baricault et al., 2007). Tuttavia questo risultato ha fornito la prima relazione diretta tra stress ossidativo ed induzione del processo di fissione mitocondriale.

OPA 1 è coinvolta nel mantenimento della struttura della membrana mitocondriale interna (m.m.i.), infatti la diminuzione nella espressione di OPA 1 causa la vacuolizzazione delle *cristae* mitocondriali (Olichon et al., 2003). Inoltre, il rimodellamento delle *cristae* è stato precedentemente associato al disassemblamento di un oligomero di OPA 1 (evidenziato mediante cross-linking) ed è necessario per il rilascio di citocromo c e la progressione della cascata apoptotica (Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006).

In questo lavoro, in mitocondri isolati da cuore in condizioni di elevato stress ossidativo è stato evidenziato un aumentato rilascio del fattore proapoptotico citocromo c. Risulterà interessante verificare il diretto coinvolgimento di OPA 1 e del complesso mediato da formazione di ponti disolfuro nella variazione della struttura mitocondriale della m.m.i. mediante microscopia elettronica. Per confermare il diretto coinvolgimento tra la formazione del complesso proteico di OPA 1 e la dinamica mitocondriale è stata scelta una strategia di tipo molecolare basata sull'individuazione dei residui cisteinici coinvolti nella formazione dell'aggregato molecolare di OPA 1.

La proteina OPA 1 appartiene alla famiglia delle dinamine ed è noto che tali proteine, contenenti domini *coiled coil*, hanno la tendenza ad associare e sono frequentemente coinvolte nella formazione di complessi ad alto peso molecolare (Shin et al., 1999). Mediante *homology modelling* tra OPA 1 ed altre proteine a struttura nota appartenenti alla famiglia delle dinamine sono stati identificati gli ipotetici residui di cisteina più probabilmente ossidabili e coinvolti nella formazione dei complessi proteici. Dall'ipotesi di dimerizzazione della proteina, le cisteine 853 ed 874 sono state individuate come i residui più probabilmente coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intermolecolari. Tali residui aminoacidici insieme alla cisteina 856 sono localizzati nella regione *coiled coil* della proteina. Recentemente, Akepati e collaboratori (Akepati et al, 2008) hanno dimostrato che la proteina OPA 1 aggrega in due diversi complessi ad alto peso molecolare, dati dall'interazione del dominio *coiled coil* della proteina. Questo lavoro corrobora il nostro modello strutturale nonostante esso sia basato su una bassa omologia di sequenza (16-30%) tra le proteine. I residui cisteinici 853, 856 e 874 sono stati quindi scelti per individuare il probabile meccanismo coinvolto nella formazione reversibile dei complessi da noi evidenziati. Sono stati a tal scopo ottenuti dei cloni cellulari MEF esprimenti in modo stabile la sola isoforma 1 umana della proteina OPA 1 non mutata (pMSCV WT) o mutata a livello dei residui cisteinici 853 e 856 (pMSCV C853-6S) e del singolo residuo 853 (pMSCV C853S).

L'espressione della proteina è stata confermata da analisi western blotting e la morfologia mitocondriale è stata analizzata in seguito a trasfezione transiente con la proteina MitoRed.

Dal punto di vista morfologico le cellule MEF possiedono mitocondri allungati ed interconnessi. L'assenza della proteina OPA 1 blocca il processo di fusione mitocondriale (Olichon et al., 2003) e la linea MEF OPA 1^{-/-} è infatti caratterizzata da mitocondri frammentati e puntiformi. L'espressione della sola isoforma 1 della proteina non mutata è in grado di ricostituire il fenotipo mitocondriale tipico dei fibroblasti murini, confermando il lavoro di Ishihara e collaboratori (Ishihara et al., 2006) in cui solo l'espressione delle isoforme lunghe di OPA 1 ripristina l'attività fusogena della proteina. I mitocondri osservati nei cloni trasfettati con il plasmide mutato pMSCV C853-6S sono puntiformi e privi di interconnessione con un fenotipo simile alle cellule MEF OPA 1^{-/-}. L'analisi indica che la mutazione dei due residui cisteinici provoca una perdita di funzionalità della proteina OPA 1 relativamente al processo di fusione mitocondriale.

L'isoforma 1 di OPA 1 mutata a livello del singolo residuo cisteinico 853 (pMSCV 853) non determina una perdita di funzionalità della proteina e le cellule trasfettate mostrano una rete mitocondriale interconnessa simile a quella evidenziata nella linea MEF WT.

I residui cisteinici della proteina OPA 1 sono altamente conservati e le cisteine 853 e 856 sono localizzate nel dominio *coiled coil* della proteina che possiede una struttura secondaria ad α -elica.

L'analisi morfologica dei cloni cellulari esprimenti la proteina mutata a livello del singolo residuo cisteinico 853 evidenzia come la singola mutazione non interferisca con la perdita di funzionalità fusogena della proteina. Al contrario, la doppia mutazione cisteina 853 e 856 all'interno dello stesso dominio proteico *coiled coil* determina un drastico cambiamento nel fenotipo di fusione mitocondriale, mostrando una completa rottura della rete mitocondriale.

È ipotizzabile che la sostituzione del gruppo tiolico della cisteina 856 con l'ossidrile della serina determini la mancata formazione di legami intramolecolari necessari per il corretto ripiegamento della proteina ed un'eventuale perdita della sua funzionalità. La variazione della struttura terziaria della proteina, causata dalla mutazione dei residui aminoacidici, potrebbe essere determinante per la perdita di attività del dominio GTPasico necessario per l'attività fusogena della proteina.

L'ipotesi di una drastica variazione della struttura proteica in seguito a modifica dei residui cisteinici 853 e 856 è avvalorata dal diverso pattern di bande di OPA 1 osservato mediante analisi western blotting.

La doppia mutazione sembra indurre una minore accessibilità al sito di clivaggio S1 presente all'interno dell'isoforma 1 della proteina. Il lavoro di Song e collaboratori (Song et al, 2007) dimostra che, in cellule esprimenti la sola isoforma 1, il blocco nel sito di clivaggio S1 della proteina determina una completa fissione mitocondriale.

Per il ripristino dell'attività fusogena di OPA 1 è quindi necessaria la presenza dell'isoforma lunga della proteina e della rispettiva isoforma corta, che, nel caso della doppia mutazione cisteinica, è meno presente.

Inoltre, in seguito ad incubazione con l'agente ossidante, nelle cellule WT e nei cloni C853S si ha un aumento del clivaggio dell'isoforma 1, mentre la proteina mutata nei residui cisteinici C853-6S va incontro a degradazione. Il clivaggio dell'isoforma 1 viene stimolata in seguito ad incubazione con lo ionoforo CCCP (carbonilcianuro-m-cloro-fenilidrazone), che provoca dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale (Song et al, 2007).

In particolare, il blocco del sito di clivaggio S1, mediante mutazione puntiforme, provoca degradazione della proteina in condizioni depolarizzanti. Il risultato attuale ottenuto suggerisce che la doppia mutazione rende la proteina maggiormente suscettibile a degradazione in condizione ossidanti, ma rimane da chiarire la diretta relazione causa-effetto.

È da notare infatti che sia nei cardiomiociti isolati, che nel cuore intero, l'aumento dello stress ossidativo, in questo caso indotto da trattamento con H_2O_2 potrebbe provocare depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale (Slodzinsky MK et al., 2008).

Al fine di verificare il coinvolgimento dei residui cisteinici mutagenizzati nella formazione del complesso proteico di OPA 1 in condizioni di elevato stress ossidativo, le cellule esprimenti la proteina mutata sono state incubate in presenza di perossido di idrogeno. L'aggregato proteico di OPA 1 non è stato evidenziato né in presenza della doppia mutazione dei residui cisteinici 853-6, dove è stata osservata degradazione della proteina, né della singola mutazione cisteina 853. È stato quindi possibile confermare che il residuo cisteinico 853 fosse coinvolto nella formazione del ponte disolfuro intermolecolare che determina l'aggregazione della proteina OPA 1 in condizioni di elevato stress ossidativo.

Data l'osservazione dell'aumentata fissione mitocondriale nelle cellule HL-1 in condizioni ossidanti, è stata quindi analizzata la relazione tra formazione del complesso proteico di OPA 1 e il processo di fusione mitocondriale nelle cellule MEF WT e nei cloni cellulari esprimenti l'isoforma 1 non mutata (pMSCV WT) e la proteina mutata in cisteina 853 (pMSCV C853S).

I risultati ottenuti in seguito ad osservazione della dinamica mitocondriale in presenza di H₂O₂ hanno evidenziato che l'espressione dell'isoforma 1 di OPA 1 (pMSCV WT) determina una tempistica di rottura della rete mitocondriale simile a quella della linea cellulare WT e pari a 20 minuti. In presenza della proteina mutata a livello del residuo cisteinico 853 (pMSCV 853), il processo di fissione viene rallentato ed, in particolare, la completa rottura della rete mitocondriale avviene in 40 minuti.

Bloccando quindi la formazione del complesso proteico di OPA 1 si assiste, in condizioni ossidanti, ad una dilatazione dell'intervallo temporale in cui avviene il processo di fissione mitocondriale.

Tale risultato conferma una relazione tra formazione del complesso proteico di OPA 1 indotto da stress ossidativo ed una perdita nell'attività fusogena della proteina.

È stato precedentemente dimostrato che la frammentazione mitocondriale non risulta necessariamente correlata all'induzione di apoptosi (Lee et al., 2004) e questi processi potrebbero essere indipendenti. Da una futura analisi del livello di apoptosi indotto da stress ossidativo nelle cellule esprimenti OPA 1 mutata in cisteina 853 potrebbe derivare una comprensione più approfondita della relazione tra blocco del processo di fusione mitocondriale e processo apoptotico.

7. BIBLIOGRAFIA

Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, and Alexander C. (2008) Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J. Neurochem.*,

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

Amati-Bonneau P, Milea D, Bonneau D, Chevrollier A, Ferré M, Guillet V, Gueguen N, Loiseau D, de Crescenzo MA, Verny C, Procaccio V, Lenaers G and Reynier P. (2009) OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*,41:1855-65

Baricault L, Ségui B, Guégand L, Olichon A, Valette A, Larminat F, and Lenaers G. (2007) OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Exp. Cell Res.*, 313:3800-3808

Beckman JS and Koppenol WH. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol*, 271:C1424-C1437

Berlett BS and Stadtman ER. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 272:20313-20316

Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, and Forte MA. (2006) The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.*, 273:2077-2099

Beyer RE. (1990) The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 8:545-565

Boveris A, Oshino N, and Chance B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 128:617-630

Cadenas E and Davies KJ. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 29:222-230

Cereghetti GM and Scorrano L. (2006) The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene*, 25:4717-4724

Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P and Scorrano L (2008) Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105:15803-15808

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, and Lesnefsky EJ. (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.*, 278:36027-36031

Cheung EC, Joza N, Steenaart NA, McClellan KA, Neuspiel M, McNamara S, MacLaurin JG, Rippstein P, Park DS, Shore GC, McBride HM, Penninger JM, and Slack RS. (2006) Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *EMBO J.*, 25:4061-4073

Cipolat S, Martins de BO, Dal Zilio B, and Scorrano L. (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 101:15927-15932

Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, and De SB. (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell*, 126:163-175

Danial NN and Korsmeyer SJ. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, 116:205-219

De Brito OM and Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456:605-10

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, starie-Dequeker C, Lasquelles L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, and Hamel CP. (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.*, 26:207-210

Delettre C, Lenaers G, Pelloquin L, Belenguer P, and Hamel CP. (2002) OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab*, 75:97-107

Delivani P and Martin SJ. (2006) Mitochondrial membrane remodeling in apoptosis: an inside story. *Cell Death. Differ.*, 13:2007-2010

Di Lisa F, Canton M, Menabo R, Kaludercic N, and Bernardi P. (2007) Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail. Rev.*, 12:249-260

Dimmer KS and Scorrano L. (2006) (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology (Bethesda.)*, 21:233-241

Ehse S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI and Langer T. (2009) Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J. Cell Biol.*, 187:1023-36

Estaquier J and Arnoult D. (2006) CED-9 and EGL-1: a duo also regulating mitochondrial network morphology. *Mol. Cell*, 21:730-732

Esterbauer H, Schaur RJ, and Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, 11:81-128

Ferre M, Amati-Bonneau P, Tourmen Y, Malthiery Y, and Reynier P. (2005) eOPA1: an online database for OPA1 mutations. *Hum. Mutat.*, 25:423-428

Finkel T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10:248-253

Finkel T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.*, 476:52-54

Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, and Youle RJ. (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell*, 1:515-525

Frezza C, Cipolat S, Martins de BO, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De SB, and Scorrano L. (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126:177-189

Gottlieb RA. (2000) Role of mitochondria in apoptosis. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 10:231-239

Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, and van der Bliek AM. (2004) Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 279:18792-18798

Griparic L, Kanazawa T. and van der Bliek AA. (2007) Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J. Cell Biol.*, 178(5):757-764

Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 13:1899-1911

Grune T, Reinheckel T, and Davies KJ. (1996) Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.*, 271:15504-15509

Grune T, Reinheckel T, Joshi M, and Davies KJ. (1995) Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.*, 270:2344-2351

Hoppins S and Lackner L. (2007) The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 76:751-780

Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, and Chan DC. (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305:858-862

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685

Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL and Youle RJ. (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell.*, 15:5001-5011

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

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, and Kroemer G. (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death. Differ.*, 6:516-524

Mannella CA. (2006a) Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta*, 1763:542-548

Mannella CA. (2006b) The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1762:140-147

McNiven MA, Cao H, Pitts KR, and Yoon Y. (2000) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem. Sci.*, 25:115-120

Messerschmitt M, Jakobs S, Vogel F, Fritz S, Dimmer KS, Neupert W and Westermann B. (2003) The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.*, 160:553-64

Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, and McBride H. (2005) Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J. Biol. Chem.*, 280:25060-25070

Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, and Lenaers G. (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 278:7743-7746

Olichon A, Landes T, maune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Guichet A, Delettre C, Hamel C, mati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Lenaers G, and Belenguer P. (2007) Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J. Cell Physiol*, 211:423-430

Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, and Floyd RA. (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87:5144-5147

Peteranderl R, Rabenstein M, Shin YK, Liu CW, Wemmer DE, King DS, and Nelson HC. (1999) Biochemical and biophysical characterization of the trimerization domain from the heat shock transcription factor. *Biochemistry*, 38:3559-3569

Peterson DB, Holian J, and Garrison WM. (1969) Radiation chemistry of the alpha-amino acids. Gamma radiolysis of solid cysteine. *J. Phys. Chem.*, 73:1568-1572

Rodgers MA, Sokol HA, and Garrison WM. (1968) The radiation-induced "hydrolysis" of the peptide bonded. *J. Am. Chem. Soc.*, 90:795-796

Rosenberg P. (2004) Mitochondrial dysfunction and heart disease. *Mitochondrion.*, 4:621-628

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

Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, and Korsmeyer SJ. (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, 300:135-139

Skulachev VP. (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.*, 26:23-29

Slodzinski MK, Aon AM, and O'Rourke B (2003) Glutathione Oxidation as a Trigger of Mitochondrial Depolarization and Oscillation in Intact Hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 45:650-660

Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, and van der Bliek AM. (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, 12:2245-2256

Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C and Chan C (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J. Cell Biol.*, 178(5):749-755

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, and Brand MD. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.*, 277:44784-44790

Stadtman ER and Berlett BS. (1991) Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.*, 266:17201-17211

Stadtman ER and Levine RL. (2000) Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 899:191-208

Sugioka R, Shimizu S, and Tsujimoto Y. (2004) Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 279:52726-52734

Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, and Kroemer G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, 184:1331-1341

Tondera D, Czauderna F, Paulick K, Schwarzer R, Kaufmann J and Santel A (2005) The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Sci.*, 118:3049-3059

Turrens JF. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol*, 552:335-344

Turrens JF, Alexandre A, and Lehninger AL. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 237:408-414

Vogt W. (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med.*, 18:93-105

Yaffe MP. (1999) Dynamic mitochondria. *Nat. Cell Biol.*, 1:E149-E150

Yamaguchi R and Perkins G. (2009) Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1787:963-72

