

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE



Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA in

SCIENZE BIOMEDICHE

XV CICLO

**Regolazione Parkin-dipendente delle componenti del
complesso dell'Uniporto Mitocondriale del Calcio**

Tutor:

Dott. Vincenzo Lariccia

Candidata:

Dott.ssa Alessandra Matteucci

Anno Accademico 2015/2016

Indice

1. Introduzione	pag.3
1.1 La degradazione delle proteine cellulari	
- La via autofagica/lisosomiale	
- Il sistema ubiquitina proteasoma (UPS)	
1.2 La degradazione delle proteine mitocondriali	
- Le proteasi della matrice	
- Le proteasi dello spazio intermembrana (IMS) e della membrana mitocondriale interna (IMM)	
- UPS e degradazione delle proteine mitocondriali	
- La mitofagia	
1.3 Il complesso dell'uniporto mitocondriale del calcio (MCU complex)	
- Il calcio mitocondriale	
- L'uniporter mitocondriale del calcio (MCU)	
- La regolazione di MCU	
1.4 Il morbo di Parkinson	
- Alterazioni nella degradazione proteica	
- Alterazioni mitocondriali	
- Parkin	
2. Scopo del lavoro	pag.16
3. Materiali e metodi	pag.17
3.1 Colture cellulari	
- Espressione di proteine esogene	
- Esperimenti di emivita	
- Esperimenti di co-espressione	
3.2 Western Blot	
3.3 PCR mutagenesi	
3.4 Immunoprecipitazioni	
3.5 Misurazione del calcio mitocondriale	

4. Risultati	pag.45
4.1 Analisi dell'emivita dei regolatori dell'uniporter mitocondriale del calcio	
4.2 Ubiquitinazione di MICU1	
4.3 Analisi del ruolo di alcune lisine di MICU1	
4.4 Modulazione Parkin-dipendente dei livelli proteici dei regolatori di MCU	
4.5 Interazione MICU1-Parkin wt	
4.6 Regolazione parte di Parkin della risposta mitocondriale al calcio	
4.7 Effetto di Pink1 sui livelli proteici di MICU1	
5. Discussione e conclusioni	pag.60
6. Bibliografia	pag.68

1. Introduzione

1.1 La degradazione delle proteine cellulari

Le cellule hanno la capacità di rispondere ed adattarsi ai cambiamenti ambientali, e questa proprietà fondamentale per la sopravvivenza è garantita principalmente dalle proteine. In ogni istante della vita cellulare, l'espressione di una proteina viene modulata non solo dal tasso di sintesi ma anche dalla velocità di degradazione (turnover proteico).

La proteolisi svolge un ruolo chiave in importanti processi fisiologici quali il differenziamento cellulare, il metabolismo lipidico, l'apoptosi (Brown, Ye et al. 2000). Data l'importanza dei sistemi di degradazione nel corretto funzionamento cellulare, non sorprende che la loro alterazione sia implicata nella patogenesi di numerose malattie umane dai tumori alle malattie neurodegenerative o infiammatorie (Reinstein and Ciechanover 2006).

Il turnover e l'emivita di una proteina cellulare, che può variare ampiamente da pochi minuti ad alcuni giorni, è finemente controllato da differenti sistemi di degradazione (Nandi, Tahiliani et al. 2006). La degradazione può avvenire nei diversi compartimenti/strutture cellulari: il citosol, la membrana, gli organelli.

Due meccanismi, altamente conservati nel mondo eucariotico, mediano la degradazione delle proteine citosoliche: la via autofagica/lisosomiale e il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) (Fig.1.1) (Bohley 1995).

La via autofagica/lisosomiale fu la prima ad essere scoperta, intorno agli anni '70, e fu considerata il principale meccanismo di proteolisi citosolica. Diversi fattori suggerivano però l'esistenza di meccanismi di degradazione non lisosomiali che furono identificati successivamente nel sistema UPS. E' oggi noto che questa è la principale via attraverso la quale avviene il controllo selettivo del turnover delle proteine, in particolare di quelle ad emivita breve (Hershko and Ciechanover 1998; Ohsumi 2006). Molte delle proteine che vengono degradate velocemente sono molecole che svolgono funzioni regolatorie, come ad esempio fattori trascrizionali, recettori, enzimi, i cui livelli devono rispondere prontamente a stimoli esterni o alle necessità cellulari.

I sistemi di degradazione, in aggiunta al turnover fisiologico, devono prontamente eliminare dalla cellula le proteine malfunzionanti o danneggiate che potrebbero altrimenti interagire con le proteine sane interferendo con le loro attività (Rivett 1990).

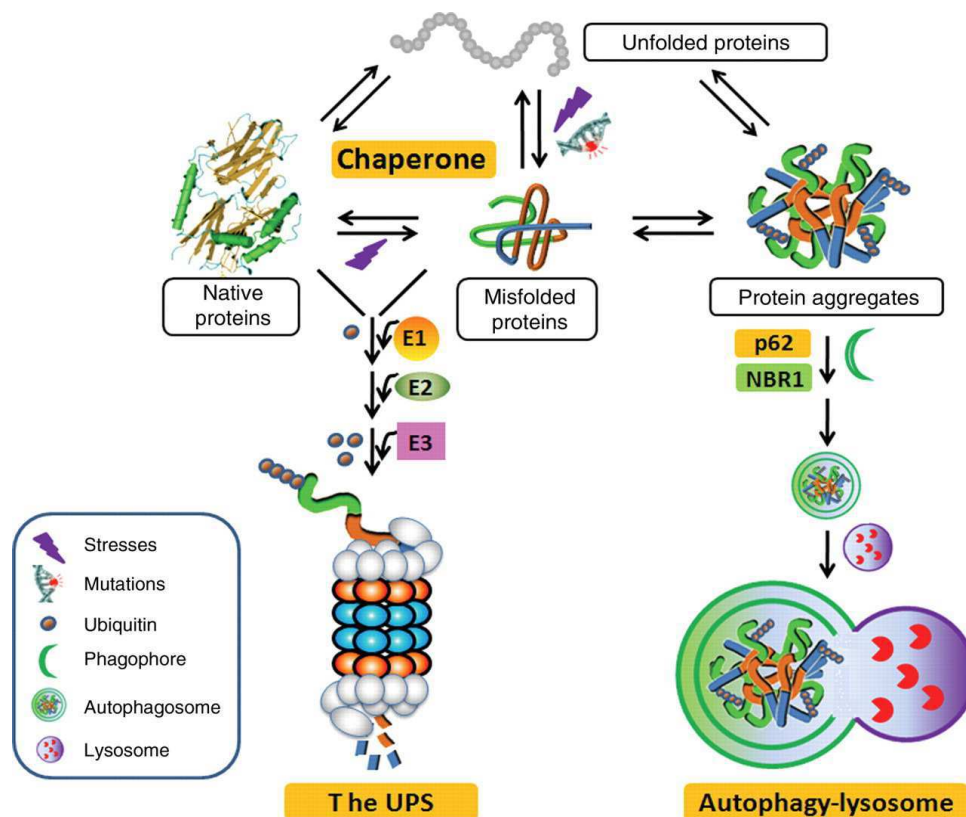


Fig 1.1 Il controllo di qualità proteico nella cellula (Su and Wang 2010).

La via autofagica/lisosomiale

Come già detto il sistema autofagico/lisosomiale è stato il primo meccanismo di degradazione proteica ad essere identificato. Proprio nel 2016 il biologo giapponese Yoshinori Ohsumi è stato insignito del premio Nobel per la Medicina per le sue scoperte sui meccanismi dell'autofagia. L'autofagia, dal greco *auto-phagein* (mangiare sé stesso), è un processo catabolico di regolazione del turnover dei componenti del citoplasma e di rimozione degli organelli danneggiati in cui il materiale viene degradato tramite i lisosomi.

Esistono tre tipi di autofagia (Fig.1.2): la microautofagia in cui i lisosomi inglobano una piccola porzione del citosol; l'autofagia mediata dagli chaperones, in cui i substrati vengono selettivamente indirizzati ai lisosomi; e la macroautofagia in cui un autofagosoma contenente grosse porzioni di citosol ed organelli intracellulari riversa il proprio contenuto nel lisosoma fondendosi con esso (Kroemer, Marino et al. 2010).

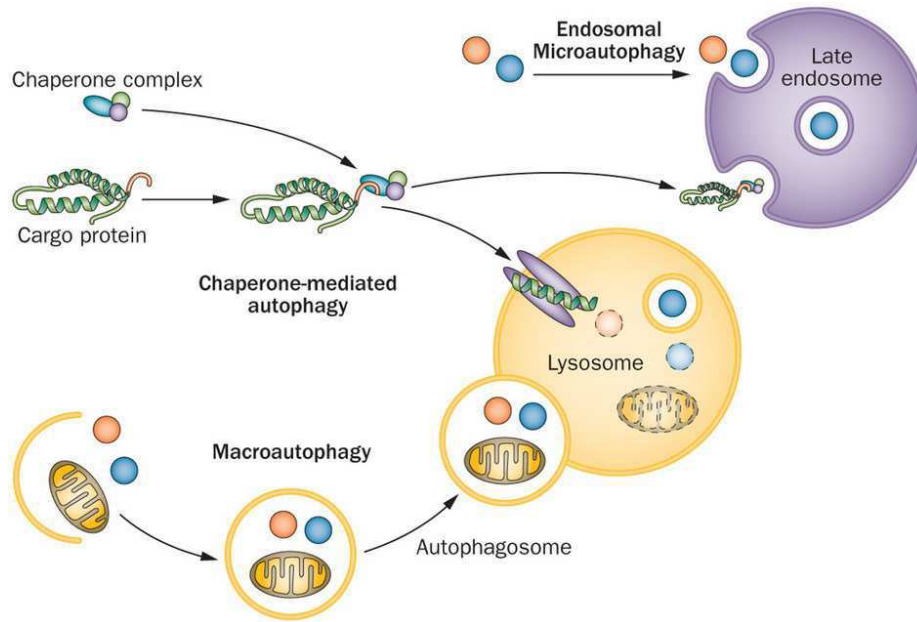


Fig. 1.2 I diversi tipi di autofagia (Schneider and Cuervo 2014).

I lisosomi sono compartimenti intracellulari racchiusi da membrana (vescicole), derivanti dal Golgi attraverso una via alternativa di secrezione che non è diretta né al reticolo endoplasmatico (RE) né all'esocitosi. Nel lume lisosomiale risiedono enzimi idrolitici, in grado di degradare proteine, lipidi e carboidrati nei loro costituenti elementari che successivamente possono essere riutilizzati in altro modo o espulsi. Questi enzimi si attivano a pH acido (4.8) che viene mantenuto e creato grazie alla presenza sulla membrana lisosomiale di pompe protoniche che introducono attivamente ioni H^+ all'interno. Il contenimento di questi enzimi nei lisosomi e valori del pH citoplasmatico non ottimali per il loro funzionamento limitano il rischio di degradazione incontrollata del contenuto cellulare e la distruzione della cellula ospitante.

Membri della famiglia degli chaperones, normalmente responsabili del corretto ripiegamento delle proteine, favoriscono la denaturazione dei substrati ed il loro trasporto attraverso la membrana lisosomiale, collaborando alla proteolisi lisosomiale (Bernales, McDonald et al. 2006).

La degradazione delle proteine nei lisosomi è un processo catabolico, determina il rilascio di composti più semplici, ad esempio gli amminoacidi, che possono essere riutilizzati per la biosintesi e la produzione di energia. Per questo motivo in situazioni di scarsità di nutrienti prevale l'utilizzo di questa via; il sacrificio di specifiche proteine permette così ai processi metabolici di base di continuare (Kawabata and Yoshimori 2015).

La via autofagica/lisosomiale è da sempre considerata un processo di degradazione scarsamente selettivo, con un ruolo prevalente nel turnover di proteine a lunga emivita. Nonostante ciò, negli ultimi anni diversi studi hanno rivelato che alcuni substrati possono essere selettivamente indirizzati verso questa via (Klionsky and Emr 2000; Cohen-Kaplan, Livneh et al. 2016).

Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)

Intorno agli anni '80 Hershko ed i suoi collaboratori osservarono sperimentalmente che la deplezione dei livelli di ATP causava una diminuzione della proteolisi intracellulare. Questa evidenza portò ad ipotizzare l'esistenza di meccanismo di degradazione proteica che, a differenza di quello lisosomiale, consuma ATP. Iniziò così la scoperta del sistema ubiquitina-proteasoma, ad oggi considerato il principale meccanismo di degradazione selettiva delle proteine cellulari (Hershko, Ciechanover et al. 1980).

L'ubiquitina (Ub) è proteina di 76 aminoacidi altamente conservata e comunemente associata alla degradazione tramite il proteasoma. Negli ultimi anni è emersa una complessità inaspettata che sembra coinvolgere l'ubiquitinazione in vie di segnalazione alternative (Fig.1.3) (Komander 2009).

L'ubiquitinazione, modificazione post-traduzionale che avviene a carico delle lisine presenti all'interno della sequenza proteica del substrato, rappresenta il segnale di riconoscimento delle proteine da degradare attraverso l'UPS. Affinchè la proteina venga riconosciuta dal proteasoma sono necessarie almeno quattro molecole, unite a

formare una catena di poliubiquitina. La concatenazione canonica avviene a carico della lisina in posizione 48 (K48), ciò produce una catena lineare; il legame su altre lisine, presenti nella sequenza dell'ubiquitina, può formare catene più ramificate come è stato recentemente dimostrato, lasciando ipotizzare ruoli diversi per tipi diversi di concatenazione (Xu, Duong et al. 2009; Kravtsova-Ivantsiv and Ciechanover 2012).

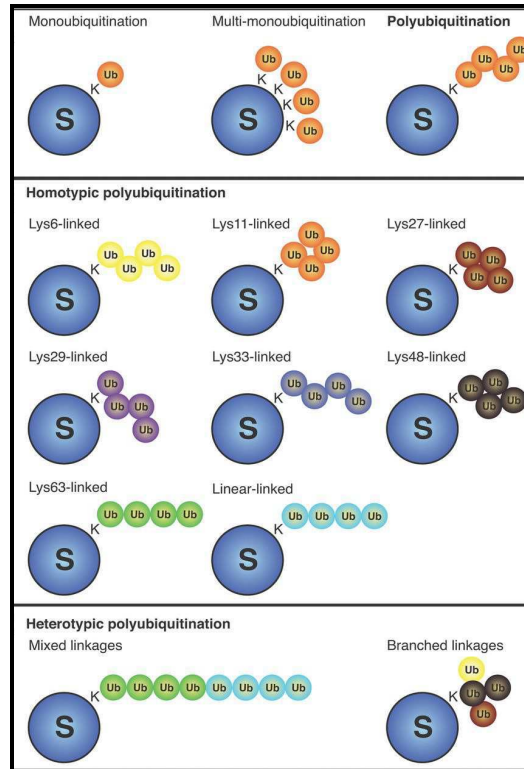


Fig. 1.3 Differenti tipi di ubiquitinazione (Komander 2009).

Il processo di poliubiquitinazione richiede tre classi di enzimi dipendenti dall'ATP: l'enzima che attiva l'ubiquitina (E1), l'enzima di coniugazione (E2) e un ubiquitina ligasi (E3) (Fig. 1.4) (Hershko and Ciechanover 1998). Il primo step di questo processo è rappresentato dall'attivazione, ATP dipendente, della glicina C-terminale dell'ubiquitina tramite l'enzima E1; la reazione genera un intermedio tio-estere ad alta energia (E1-S-Ub). Il secondo step prevede il trasferimento dell'ubiquitina, legata ad E1, al residuo di cisteina presente nel sito attivo dell'enzima E2 tramite transesterificazione. Infine la ligasi (E3) trasferisce l'ubiquitina ad un residuo di lisina del

substrato, ciò può avvenire in maniera diversa a seconda della classe di E3-ligasi (RING, HECT, U-box) (Harper and Schulman 2006; Finley, Ulrich et al. 2012). La concatenazione di ubiquitine viene successivamente costruita tramite lo stesso processo, o tramite un tipo addizionale di ligasi (E4) denominate fattori di allungamento (Koegl, Hoppe et al. 1999).

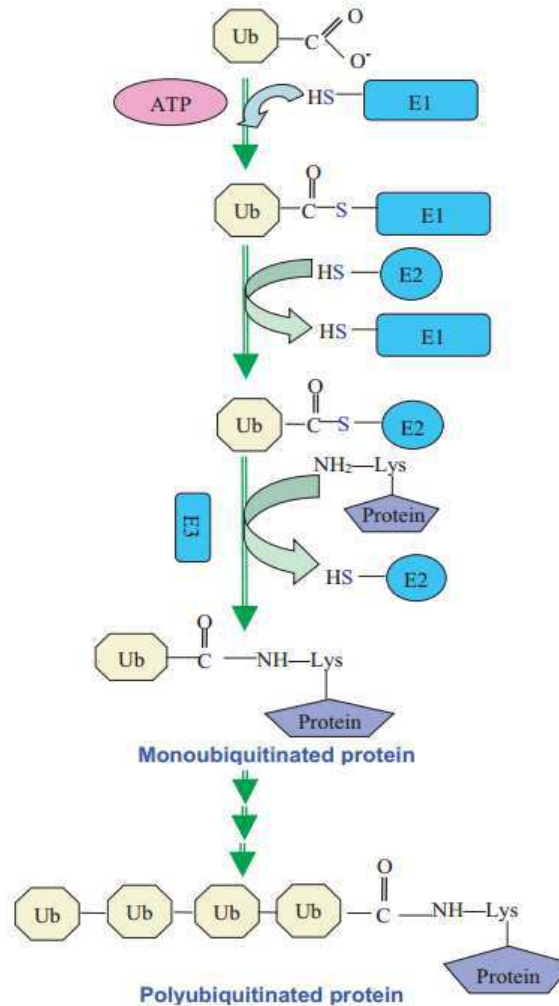


Fig. 1.4 Processo di ubiquitinazione proteica (Nandi, Tahiliani et al. 2006).

Il processo di ubiquitinazione nei mammiferi è costruito in maniera gerarchica: esiste un solo enzima E1 codificato dal genoma, circa 37 enzimi di coniugazione (E2) mentre quasi 1000 sono le E3-ligasi. Ciò permette l'utilizzo del medesimo macchinario nelle

prime due fasi e, nella terza, di garantire una maggiore specificità nel riconoscimento del substrato. Appena prima della degradazione enzimi deubiquitinanti (DUBs) tagliano e riciclano le molecole di ubiquitina dal substrato in modo da poter essere riutilizzate (Crosas, Hanna et al. 2006).

Una proteina può essere indirizzata alla degradazione anche senza particolari alterazioni ma semplicemente seguendo il normale turnover fisiologico (degradazione costitutiva). In molti altri casi il substrato viene riconosciuto dalla sua specifica ligasi solo se è andato incontro ad una modificazione post-traduzionale (fosforilazione, ossidazione) o ad una alterazione conformazionale (Glickman and Ciechanover 2002).

Le proteine poliubiquitinate vengono riconosciute e degradate da un grosso complesso proteico presente nel citosol, conosciuto come 26S proteasoma (Fig.1.5). Questa struttura proteica multisubunità è principalmente composta da due sottocomplessi: la componente centrale (20S, core) e una o due componenti regolatorie (19S) (Voges, Zwickl et al. 1999; Wehmer and Sakata 2016).

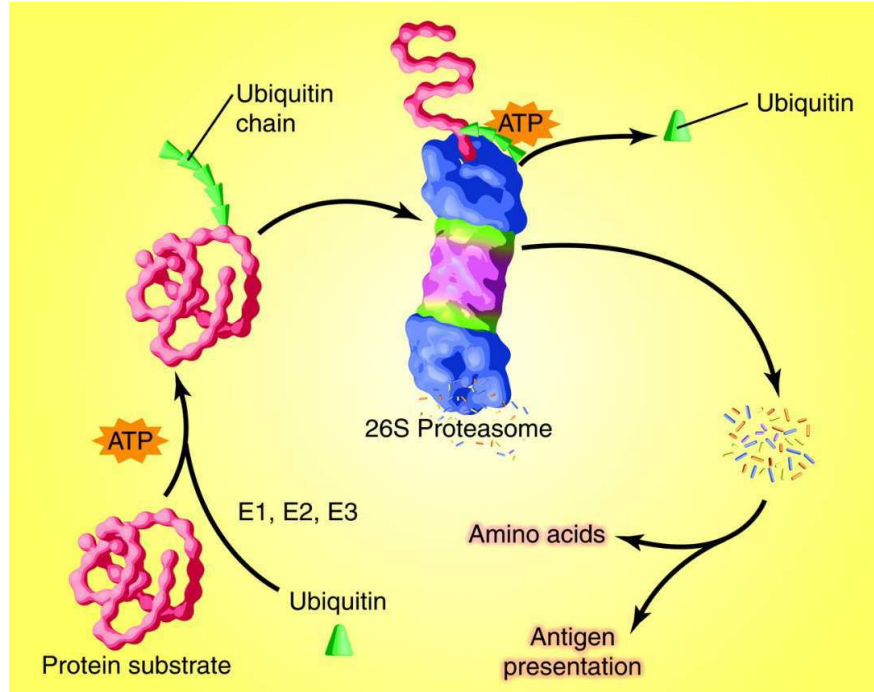


Fig. 1.5 Rappresentazione schematica del sistema di degradazione ubiquitina-proteasoma (UPS) (Lecker, Goldberg et al. 2006).

Il proteasoma lavora tramite un meccanismo a più fasi, in cui il taglio dei legami peptidici rappresenta soltanto l'ultimo tassello di un articolato programma di manipolazione del substrato. Processi di riconoscimento, denaturazione, traslocazione e deubiquitinazione avvengono precedentemente e a distanza dal sito di proteolisi. La presenza di recettori per l'ubiquitina (Ubiquitin Binding Proteins, UBPs) sulle subunità regolatorie (19S) permettono il riconoscimento del substrato poliubiquitinato (Grice and Nathan 2016). L'azione di sei distinte ATPasi, che formano un complesso ad anello, guidano la proteina attraverso i processi di deubiquitinazione e denaturazione necessari per la traslocazione all'interno del core (20s). Questa componente centrale del proteasoma è formata da quattro anelli, ognuno composto da sette subunità, i due anelli centrali contengono il sito catalitico rivolto all'interno a formare una vera e propria camera proteolitica (Wehmer and Sakata 2016). La struttura compartimentalizzata del proteasoma riflette il meccanismo di degradazione processiva dei substrati (Fig. 1.6). La proteolisi avviene gradualmente man mano che la proteina si addentra nel core proteasomico, limitando in questo modo potenziali interferenze delle funzioni cellulari da parte di proteine troncate. La degradazione proteasomica non genera singoli aminoacidi ma produce un misto eterogeneo di piccoli peptidi (7-9 aminoacidi), che verranno successivamente frammentati dalle proteasi presenti nel citosol (Finley 2009).

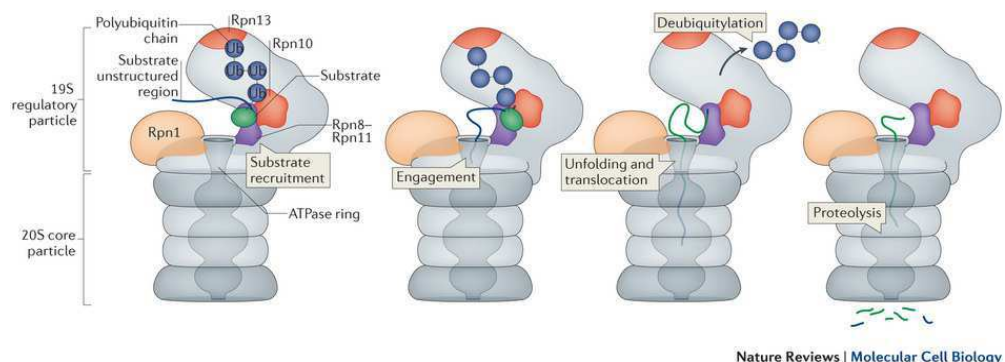


Fig. 1.6 Tappe della degradazione proteasomica (Bhattacharyya, Yu et al. 2014).

Date le sue dimensioni, il proteasoma è da sempre considerato responsabile esclusivamente della degradazione delle proteine citosoliche. Negli ultimi anni sono emersi meccanismi di retrotraslocazione di proteine dagli organelli, aprendo alla possibilità di una loro degradazione tramite UPS, sia nel caso del reticolo endoplasmatico (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, ERAD) (Needham and Brodsky 2013; Lemus and Goder 2014) che dei mitocondri (Chatenay-Lapointe and Shadel 2010).

1.2 La degradazione delle proteine mitocondriali

I mitocondri sono organelli intracellulari, di forma allungata, delimitati da un doppio strato di membrane e contenenti un proprio DNA. La maggior parte dei processi molecolari che avvengono nei mitocondri sono essenziali per la sopravvivenza cellulare (Fig.1.7). Oltre alla fosforilazione ossidativa, responsabile della produzione di energia, i mitocondri svolgono un ruolo cruciale nel metabolismo intermedio, nelle vie di segnalazione del calcio e nei meccanismi di morte cellulare (McBride, Neuspiel et al. 2006). Disfunzioni di questo organello sono responsabili dell'invecchiamento cellulare e di molte patologie umane come diabete, cancro e malattie neurodegenerative (Chan 2006).

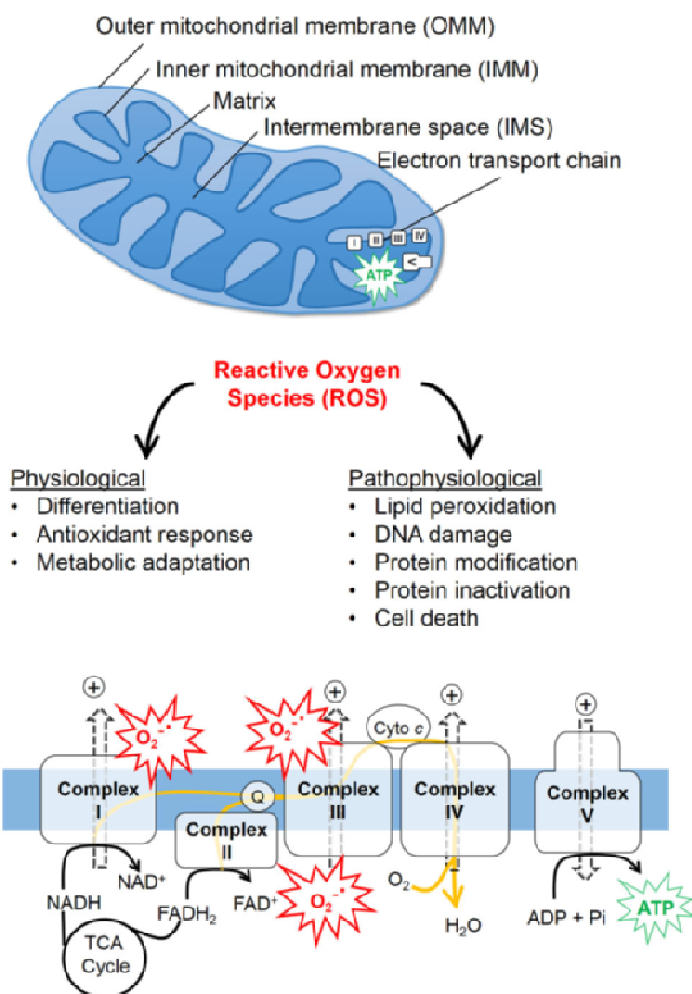


Fig. 1.7 Funzioni e disfunzioni mitocondriali (Hamacher-Brady and Brady 2016).

Per rispondere prontamente alle necessità cellulari, i mitocondri vanno incontro a costanti fenomeni di fissione, fusione e cambiamenti di forma. Inoltre, affinché venga garantita la loro dinamicità, è fondamentale per questi organelli il controllo della biogenesi e dell'omeostasi proteica (Taylor, Fahy et al. 2003; Okamoto and Shaw 2005).

All'incirca 1000 sono le proteine con localizzazione mitocondriale nota; la maggior parte sono codificate dal genoma nucleare e successivamente importate nei mitocondri. Il controllo di qualità su queste proteine viene garantito da elaborati sistemi proteolitici responsabili sia del turnover fisiologico sia della degradazione di proteine danneggiate o non funzionanti.

Il principale sistema di sorveglianza nei mitocondri è costituito da diverse classi di proteasi presenti in ogni sub-compartmento (matrice, membrana mitocondriale interna, spazio intermembrana) (Koppen and Langer 2007; Rugarli and Langer 2012). Inoltre proteine presenti nella membrana mitocondriale esterna possono essere controllate del sistema citosolico ubiquitina-proteasoma (Fig.1.8) (Kaser and Langer 2000; Baker and Haynes 2011). Infine quando i mitocondri sono ampiamente danneggiati o diventano superflui a causa di modificazioni nelle richieste energetiche, possono essere rimossi attraverso una degradazione non selettiva di tipo macroautofagico, in questo caso denominata mitofagia.

La presenza di differenti meccanismi degradativi garantisce il corretto funzionamento dei mitocondri e permette di regolarne l'attività a seconda delle necessità cellulari (Mijaljica, Prescott et al. 2007; Campello, Strappazon et al. 2014; Hamacher-Brady and Brady 2015).

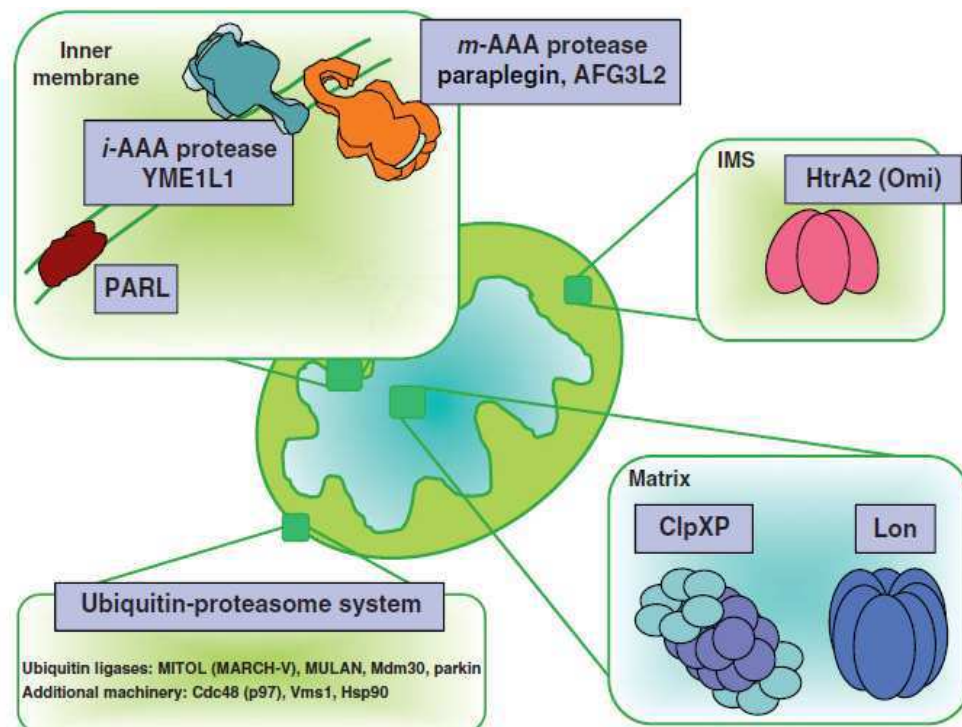


Fig. 1.8 Controllo di qualità proteico nei diversi compartimenti mitocondriali (Baker and Haynes 2011).

Le proteasi della matrice

Il più alto livello di regolazione della proteolisi mitocondriale avviene nella matrice, compartimento ad elevata densità proteica. Qui sono presenti i macchinari per la trascrizione e traduzione del DNA mitocondriale, tutti gli enzimi responsabili del Ciclo degli Acidi Tricarbossilici (TCA) e di altre vie metaboliche. Il corretto ripiegamento delle proteine della matrice è facilitato dalla presenza di chaperones, in particolare HSP70 e HSP60 (Kang, Ostermann et al. 1990; Koll, Guiard et al. 1992), mentre il loro turnover viene garantito principalmente dalla presenza di due proteasi ATP-dipendenti appartenenti alla classe delle AAA-proteasi, Lon e ClpXP (Wang, Maurizi et al. 1994; Santagata, Bhattacharyya et al. 1999).

Lon è una serin-proteasi con struttura eptamerica a forma di anello. Riconosce proteine danneggiate, in particolare ossidate, o mal ripiegate e ne media la completa proteolisi, prevenendone l'accumulo e i possibili effetti deleteri sui mitocondri. Un prerequisito fondamentale per la proteolisi Lon-dipendente sembra essere la non aggregazione dei suoi substrati, il cui mantenimento in una conformazione solubile viene garantito dalla cooperazione con chaperones della famiglia di HSP70 (Wagner, Arlt et al. 1994). Il taglio proteolitico ad opera di Lon avviene inizialmente tra aminoacidi idrofobici del substrato, circondati da regioni altamente cariche ed esposti sulla superficie della proteina (Ondrovicova, Liu et al. 2005).

Oltre alla funzione di controllo di qualità, le proteasi Lon presentano un ruolo importante nella biogenesi dei mitocondri grazie alla loro peculiare affinità per gli acidi nucleici che ne suggerisce un coinvolgimento nella stabilità e nell'ereditarietà del DNA mitocondriale (Liu, Lu et al. 2004).

L'altra proteasi che agisce nella matrice, ClpXP, presenta una struttura etero-oligomerica in cui la componente ClpP ha attività catalitica, mentre le subunità ClpX permettono il riconoscimento del substrato e l'idrolisi dell'ATP. La maggior parte delle informazioni sulla funzione di ClpXP derivano da omologhi batterici, di lievito o da esperimenti *in vitro* che ne suggeriscono un ruolo simile a Lon nel controllo di qualità delle proteine mitocondriali (Zhao, Wang et al. 2002).

Le proteasi dello spazio intermembrana (IMS) e della membrana mitocondriale interna (IMM)

Le proteine codificate dal genoma nucleare e destinate ai compartimenti interni del mitocondrio, durante il passaggio in un ambiente altamente ossidante quale lo spazio intermembrana, devono essere mantenute in una conformazione lineare e protette dall'interazione con altre proteine. Quando ciò non avviene meccanismi degradativi provvedono all'eliminazione delle proteine danneggiate.

L'unica proteasi solubile riscontrata nello spazio intermembrana è rappresentata da HtrA2/Omi, una serin-proteasi omo-trimerica membro di una famiglia conservata di proteine collegate al controllo di qualità in vari organismi (Hegde, Srinivasula et al. 2002). Sebbene diversi substrati siano stati identificati, la sua funzione nella degradazione di proteine mitocondriali non è ben chiara (Johnson and Kaplitt 2009).

Nella membrana mitocondriale interna (IMM) è invece ben caratterizzato un gruppo altamente conservato di proteasi ATP-dipendenti, le AAA-proteasi (ATPases Associated with diverse cellular Activities) (Snider, Thibault et al. 2008). La IMM è densamente popolata da proteine (le componenti della catena respiratoria sono le più rappresentative) sottoposte costantemente ad un controllo di qualità esercitato da due complessi di membrana: i-AAA e m-AAA, orientati rispettivamente verso lo spazio intermembrana e verso la matrice. Il coinvolgimento dell'uno o dell'altro sembra essere mediato principalmente da come sono disposti i substrati nella membrana (Leonhard, Guiard et al. 2000).

Anche se l'azione degradativa viene esercitata prevalentemente su proteine di membrana (integrali o associate), recenti dati suggeriscono che anche proteine solubili presenti nella matrice e nello spazio intermembrana possono essere processate da queste peptidasi (Lee, Augustin et al. 2011).

La struttura omo-oligomerica delle AAA-proteasi è composta da diverse subunità ognuna con attività ATPasica, il dominio catalitico con attività di metallopeptidasi è presente a livello C-terminale. Il riconoscimento di domini idrofobici esposti o strutture mal ripiegate, anche solo di 20 aminoacidi, è sufficiente per l'attacco proteolitico. Durante la proteolisi le AAA-proteasi sono in grado di traslocare i substrati, in maniera ATP-dipendente, attraverso la membrana determinando una completa degradazione anche dei domini presenti nel versante opposto (Tatsuta,

Augustin et al. 2007). E' stato inoltre osservato che la simultanea delezione delle i-AAA e delle m-AAA proteasi risulta letale per le cellule, ciò ne ha fatto ipotizzare il ruolo in fenomeni alternativi, come la biogenesi mitocondriale (Quiros, Langer et al. 2015).

UPS e degradazione delle proteine mitocondriali

Il coinvolgimento del sistema di degradazione citosolico ubiquitina-proteasoma (UPS) nel controllo di qualità di proteine mitocondriali è stato messo alla luce solo recentemente (Haynes and Ron 2010). Diversi studi proteomici hanno infatti dimostrato che proteine mitocondriali possono, contrariamente a quanto finora ipotizzato, essere sottoposte ad ubiquitinazione (Peng, Schwartz et al. 2003).

E' possibile che proteine destinate ai mitocondri siano soggette al controllo da parte dell'UPS già nel citosol, prima del loro ingresso negli organelli come dimostrato per alcune proteine dello spazio intermembrana (Bragoszewski, Gornicka et al. 2013).

Il sistema UPS può inoltre colpire proteine localizzate sulla membrana mitocondriale esterna (OMM) e direttamente accessibili alla sua azione di ubiquitinazione e degradazione proteasomica. E' noto che diverse ubiquitina-ligasi (MITOL, MULAN, mdm30) localizzano nel versante citosolico della OMM, dove sembrano influenzare le dinamiche mitocondriali controllando la degradazione di proteine coinvolte nei processi di fissione e fusione (Neutzner, Benard et al. 2008). Inoltre, l'ubiquitina ligasi citosolica Parkin mostra una caratteristica localizzazione mitocondriale in condizioni di stress/deficit energetico, inducendo la degradazione proteasoma-dipendente di proteine coinvolte nella forma e nella motilità dei mitocondri (mitofusine, MIRO) e prevenendo così la fusione di organelli difettosi, destinati ad essere degradati tramite mitofagia (Gegg, Cooper et al. 2010; Wang, Song et al. 2011). Il ruolo di Parkin nel controllo di qualità dell'intero organello è ormai chiaro ma il meccanismo attraverso il quale vengono riconosciute proteine danneggiate deve ancora essere identificato.

Infine, un controllo dell'UPS sul turnover di proteine mitocondriali potrebbe anche avvenire a seguito della loro retrotraslocazione alla membrana mitocondriale esterna attraverso un meccanismo simile alla degradazione delle proteine del reticolo endoplasmatico tramite ERAD (Augustin, Nolden et al. 2005; Livnat-Levanon and Glickman 2011; Taylor and Rutter 2011).

La mitofagia

Il processo di degradazione dei mitocondri tramite autofagia, detto appunto mitofagia, rappresenta un importante meccanismo di controllo di qualità che porta alla completa eliminazione dei mitocondri danneggiati o non funzionanti.

Il coinvolgimento del sistema autofagico/lisosomiale nelle dinamiche mitocondriali è stato evidenziato sperimentalmente, *in vitro* ed *in vivo*, attraverso la creazione di sistemi knockout in cui l'assenza di proteine dell'autofagia provocava un ingrossamento mitocondriale, un aumento del numero di mitocondri malfunzionanti e di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (Tal, Sasai et al. 2009). La mitofagia è, inoltre, parte integrante dei processi di sviluppo e morte cellulare ed il suo controllo è altamente integrato con i meccanismi che regolano la morfologia e le dinamiche mitocondriali (Twig, Elorza et al. 2008).

Sebbene in passato prevaleva l'idea che questo sistema degradasse i suoi substrati in maniera indiscriminata, oggi diverse evidenze sperimentali hanno messo in luce meccanismi regolatori più complessi. Due sono le vie meglio caratterizzate che regolano la mitofagia (Fig. 1.9).

La via più nota è controllata dalla serina/treonina chinasi Pink1 e dalla E3 ligasi Parkin (Pickrell and Youle 2015). In una cellula sana, Pink1 viene importata nello spazio intermembrana e rapidamente degradata dalle peptidasi mitocondriali e da PARL (Jin, Lazarou et al. 2010). La depolarizzazione mitocondriale inattiva l'importo e la degradazione di Pink1 determinandone l'esposizione sulla membrana mitocondriale esterna, inducendo la traslocazione di Parkin ai mitocondri attraverso due meccanismi: la fosforilazione delle mitofusine (Mfn1-2), che fungono da recettori, e di Parkin stessa (Matsuda, Sato et al. 2010; Shiba-Fukushima, Imai et al. 2012; Chen and Dorn 2013).

A seguito del reclutamento, Parkin induce l'ubiquitinazione e la degradazione delle mitofusine e di Miro, inducendo la frammentazione mitocondriale, il rilascio dal citoscheletro e la segregazione dei mitocondri danneggiati (Wang, Winter et al. 2011).

La seconda via di regolazione della mitofagia è mediata da proteine e lipidi sulla membrana mitocondriale esterna che fungono da recettori. Per esempio, la cardiolipina mitocondriale o la proteina FUNDC1 sono in grado di legare direttamente LC3 determinando il contatto diretto tra il mitocondrio e l'autofagosoma (Liu, Feng et al. 2012; Chu, Bayir et al. 2013).

In maniera simile, Nix/BNIP3, proteine pro-apoptotiche presenti nella OMM, sono in grado di dirigere i mitocondri all'autofagosoma (Novak, Kirkin et al. 2010; Hanna, Quinsay et al. 2012).

La mitofagia sotto controllo di Nix/BNIP3 sembra essere prevalente in condizioni basali, consentendo l'eliminazione di mitocondri mal funzionanti che si accumulano con l'età. In condizioni di stress invece è la via Pink1/Parkin ad avere il ruolo da protagonista. Sebbene queste funzioni sembrano essere distinte, probabilmente c'è un sostanziale interscambio tra le due vie (Ashrafi and Schwarz 2013).

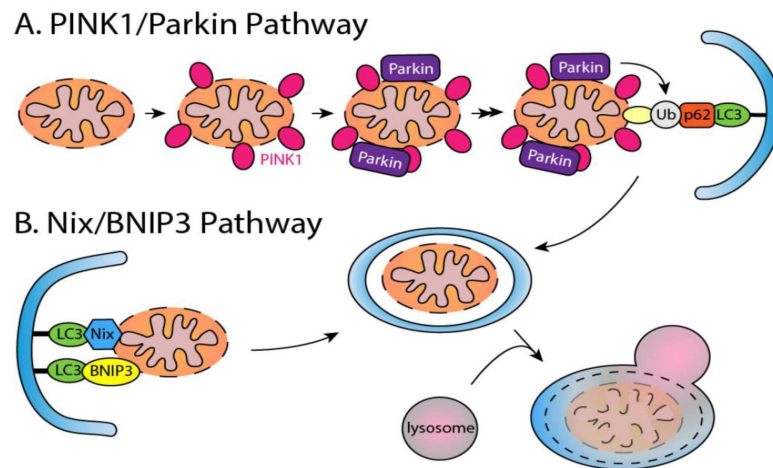


Fig 1.9 Principali meccanismi di attivazione della mitofagia (Hammerling and Gustafsson 2014).

1.3 Il complesso dell'Uniporto Mitochondriale del Calcio (MCU complex)

I mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nell'evoluzione delle cellule eucariotiche per il loro ruolo centrale nella produzione di energia. Negli ultimi decenni sono venute alla luce nuove funzioni biologiche di questo organello, una di queste è rappresentata dalla capacità di partecipare alla regolazione della concentrazione di calcio citoplasmatico $[Ca^{2+}]_c$.

Il calcio influenza ogni aspetto della vita cellulare rappresentando uno dei principali mediatori nelle vie di segnalazione intracellulare. Affinché possa svolgere questo ruolo è necessario che la sua concentrazione vari velocemente ed in maniera efficiente nello spazio e nel tempo (Clapham 2007).

I flussi di calcio originano principalmente da due fonti: lo spazio extracellulare e i depositi intracellulari. In condizioni basali la concentrazione citosolica di calcio viene mantenuta a livelli molto bassi ($0.1 \mu\text{M}$), per questo motivo anche piccole fluttuazioni possono indurre effetti significativi, che vanno a stimolare numerosi processi fisiologici calcio-dipendenti come la contrazione muscolare, la secrezione ormonale, la trasmissione sinaptica, la proliferazione cellulare, l'apoptosi e molti altri (Berridge, Lipp et al. 2000).

Le fluttuazioni rapide o sostenute di calcio vengono risolte attraverso l'azione di proteine tamponanti e sistemi di trasporto di membrana (cellulare o di organelli), limitando in questo modo la stimolazione ad esse associata (Fig. 1.10) (Berridge 2009).

Il reticolo endoplasmatico (RE) rappresenta il più importante deposito cellulare di calcio sebbene anche altri organelli, come l'apparato di Golgi, gli endosomi e i mitocondri si sono dimostrati in grado di partecipare alle vie di segnalazione del calcio agendo da sistemi tamponanti (Pinton, Brini et al. 1998; Pinton, Pozzan et al. 1998).

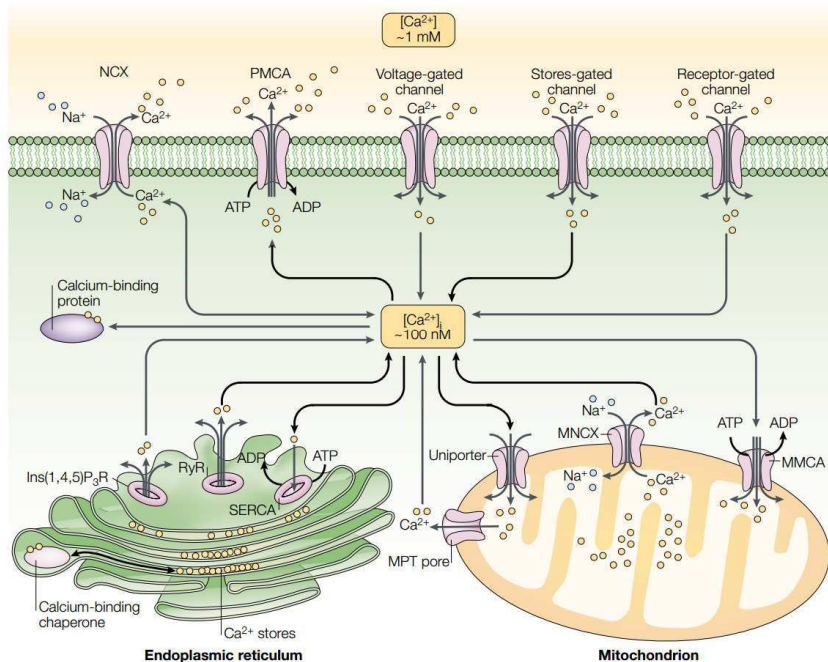


Fig. 1.10 Meccanismi di omeostasi cellulare del calcio (Syntichaki and Tavernarakis 2003).

La capacità dei mitocondri di sequestrare calcio al proprio interno è nota dagli anni '60, ma per molto tempo si è esclusa la possibilità che ciò avesse un ruolo importante nella regolazione citoplasmatica (Dupont and Combettes 2016). Soltanto negli ultimi anni,

grazie allo sviluppo di nuove tecnologie, si è riaperto l'interesse scientifico nei confronti di questo organello mettendo in evidenza la sua dinamicità e centralità negli eventi cellulari. L'aumento delle conoscenze sul ruolo svolto dal calcio mitocondriale lo hanno posto al centro di fenomeni cellulari importanti come la regolazione della bioenergetica cellulare e l'apoptosi (Duchen 2000).

Il calcio mitocondriale

La capacità dei mitocondri di tamponare aumenti di calcio citosolico fu descritta, per la prima volta, in due esperimenti chiave in cui sonde per il calcio vennero geneticamente modificate affinché localizzassero in determinati organelli intracellulari. Prima, Rizzuto ed i suoi collaboratori, utilizzando una proteina luminescente sensibile al calcio, l'Aequorina, con localizzazione mitocondriale, dimostrarono che piccoli aumenti di calcio nel citoplasma erano affiancati da un notevole aumento di calcio nella matrice (Rizzuto, Simpson et al. 1992). Poi, l'utilizzo di due diverse proteine fluorescenti, una localizzata nei mitocondri e una nel RE, ha permesso di dimostrare l'esistenza di piccole regioni (5-20% della superficie totale) a stretto contatto tra i mitocondri e il reticolo endoplasmatico, definite MAM (mitochondria-associated membranes) (Fig.1.11). Venne osservato che le onde di calcio diramate dal RE potevano essere immediatamente captate dal mitocondrio influenzandone la funzione e modulando quindi la risposta ai diversi stimoli cellulari (Rizzuto, Pinton et al. 1998).

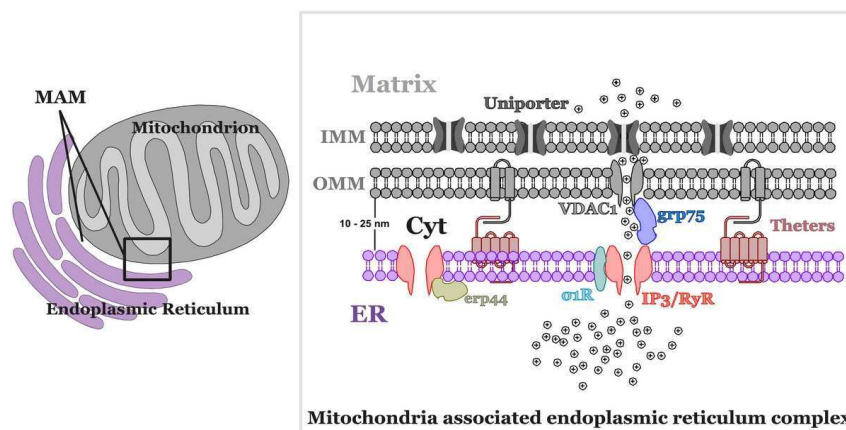


Fig.1.11 Associazione tra mitocondri e reticolo endoplasmatico (Szopa, Dyzma et al. 2013).

L'ingresso del calcio nei mitocondri si verifica principalmente attraverso l'Uniporter Mitocondriale (MCU), canale a bassa affinità presente a livello della membrana mitocondriale interna, e avviene senza utilizzo di ATP o cotrasporto di altri ioni. La forza trainante deriva dal gradiente elettrochimico ($\Delta\Psi$ -180 mV) instaurato a cavallo della IMM dalla catena respiratoria attraverso l'estrusione di protoni. Oltre a ciò, la prossimità strategica tra mitocondri e RE genera microdomini in cui vengono raggiunte $[Ca^{2+}]$ notevolmente più alte di quelle che possono essere raggiunte nel citosol, giustificando l'enorme ingresso di calcio mitocondriale nonostante la bassa affinità del macchinario di importo. (Csordas, Thomas et al. 1999)

Il principale ruolo fisiologico del calcio nei mitocondri è rappresentato dal controllo del metabolismo aerobico, allo scopo di adattare il tasso di produzione di ATP alle necessità cellulari. Diversi enzimi che partecipano al ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) sono attivati dal calcio: la piruvato, l' α -chetoglutarato e la isocitrato deidrogenasi (denominate collettivamente deidrogenasi mitocondriali calcio-sensibili). Questi tre enzimi catalizzano reazioni limitanti del TCA e modulano la quantità di elettroni disponibili nella catena respiratoria per la produzione di ATP (McCormack and Denton 1990). Esistono altri meccanismi calcio-dipendenti che controllano il metabolismo mitocondriale come ad esempio alcuni trasportatori di metaboliti, presenti nella membrana mitocondriale interna, responsabili del rifornimento di substrati nella matrice (Lasorsa, Pinton et al. 2003).

Un ruolo più ampio del calcio nella bioenergetica cellulare avviene attraverso il controllo dell'autofagia, risposta adattativa alla scarsità di nutrienti. Affinché questa venga soppressa, è infatti richiesto un trasferimento costitutivo di calcio dal RE ai mitocondri (Cardenas, Miller et al. 2010).

Ogni qual volta che il calcio ha compiuto la propria funzione, sono necessari rapidi meccanismi che ne determinano la fuoriuscita dai mitocondri, in modo tale da ricostituirne il livello basale.

L'efflusso di calcio, in particolare nelle cellule eccitabili, è un fenomeno sodio-dipendente, che ha fatto supporre l'esistenza di uno scambiatore Na^+/Ca^{2+} (mNCX) a livello della IMM ma l'identità molecolare di questa proteina è tuttora dibattuta (Gobbi, Castaldo et al. 2007; Palty, Silverman et al. 2010).

Se i meccanismi di regolazione falliscono, un sovraccarico di calcio nei mitocondri induce l'apertura del PTP (permeability transition pore). Questo canale ad elevata conduttanza causa un rapido collasso del potenziale mitocondriale ($\Delta\Psi$), seguito da una crisi energetica, con conseguente rilascio di fattori pro-apoptotici, quale il citocromo C, AIF, Smac/DIABLO, che avviano alla morte cellulare (Fig. 1.12) (Giorgi, Romagnoli et al. 2008; Rizzuto, De Stefani et al. 2012)

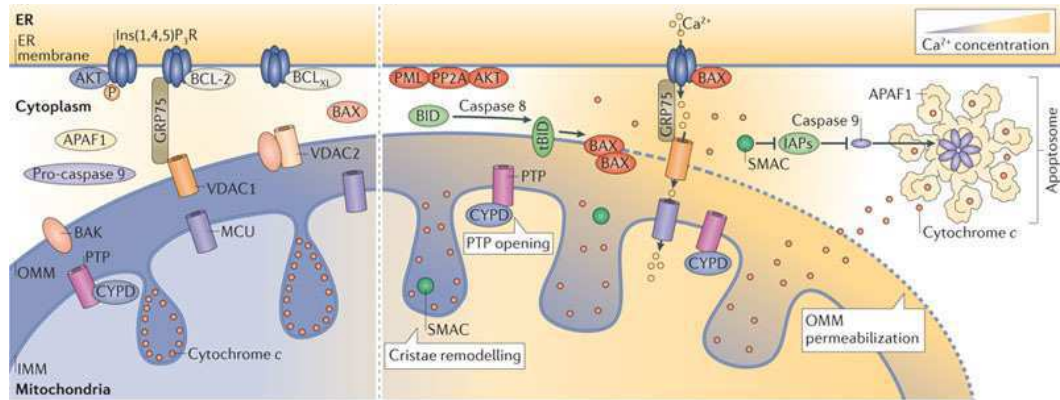


Fig. 1.12 Alterazione dell'omeostasi mitocondriale del calcio (Rizzuto, De Stefani et al. 2012).

L'Uniporter Mitocondriale del Calcio (MCU)

In passato lo studio dei fenomeni cellulari mediati dal calcio mitocondriale è stato fortemente limitato dal fatto che non si conoscesse l'identità della proteina responsabile dell'ingresso di questo ione nei mitocondri. L'esistenza di questo canale era ampiamente accettata fin dal 1970 ma la sua caratterizzazione molecolare è stata rivelata solo recentemente, grazie ai vantaggi dell'utilizzo di approcci genomici.

Prima della scoperta erano note alcune proprietà fisiche del meccanismo di ingresso di calcio, tra cui il fatto che fosse dipendente dal potenziale mitocondriale e che la sua attività fosse inibita dal Rosso Rutenio (Bernardi 1984). Inoltre, i risultati di esperimenti funzionali, tramite tecniche di elettrofisiologia, avevano già chiarito che il trasporto fosse mediato da un canale e non da un trasportatore (Kirichok, Krapivinsky et al. 2004).

Un punto di svolta avvenne nel 2008 quando Mootha ed i suoi collaboratori, allo scopo di identificare nuove proteine mitocondriali, costruirono una genoteca, chiamata

MitoCarta. Questa era basata su analisi di spettrometria di massa di preparazioni mitocondriali altamente purificate da differenti tessuti murini (Pagliarini, Calvo et al. 2008). Grazie alla ricerca in questa banca dati, nel 2011 due laboratori identificarono simultaneamente una proteina, codificata dal gene *CCDC109A*, che soddisfaceva tutte le caratteristiche dell'uniporter mitocondriale del calcio (MCU) (De Stefani, Raffaello et al. 2011; Baughman, Perocchi et al. 2011). Quando veniva purificata e introdotta in doppi strati lipidici planari questa proteina era in grado di costituire un canale sensibile al Rutenio. Attraverso approcci sperimentali differenti venne dimostrato che l'overespressione di *CCDC109A* aumentava l'ingresso di calcio nei mitocondri mentre il suo silenziamento lo riduceva; l'assenza totale del gene produceva inoltre una completa inibizione della captazione di calcio in risposta a stimoli citosolici.

CCDC109A, rinominata ora MCU, codifica per una proteina di 36 kDa, con due domini transmembrana uniti da una piccola regione idrofila contenente il dominio DIME, le cui cariche negative sembrano essere fondamentali per l'ingresso di calcio nei mitocondri. La formazione del canale prevede la presenza di quattro subunità identiche di MCU a formare una struttura tetramericata (Raffaello, De Stefani et al. 2013). In questi anni diversi studi hanno identificato altre proteine associate al canale, confermando che MCU ha una struttura multisubunitaria con diversi regolatori associati; il controllo dell'ingresso di calcio nei mitocondri si è quindi dimostrato più complesso di quanto atteso (Fig. 1.13).

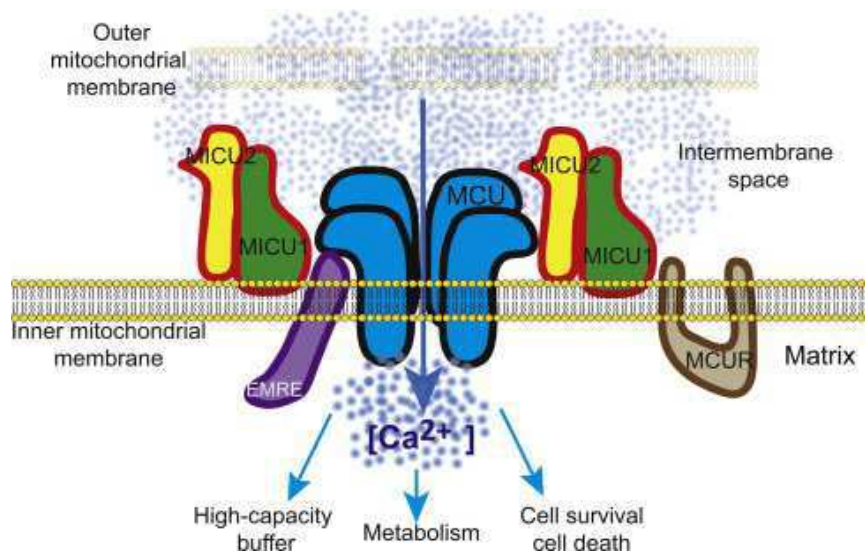


Fig. 1.13 Complesso dell'uniporto mitocondriale del calcio (Murgia and Rizzuto 2014).

La regolazione di MCU

La maggior parte delle proteine associate a MCU ha una funzione regolatoria sull'attività del canale. Data la recente identificazione delle varie componenti del complesso, i meccanismi attraverso cui queste agiscono non sono stati completamente elucidati. Al momento i regolatori noti di MCU sono: MCUB, MICU1, MICU2, MICU3, MCUR1 e EMRE.

MICU1 (Mitochondrial Calcium Uptake 1) fu identificato attraverso la banca dati MitoCarta, precedentemente a MCU e scambiato con esso poiché presentava molte delle caratteristiche ricercate (un dominio transmembrana, domini sensibili al calcio e capacità di modulazione della risposta mitocondriale), ma soltanto nel 2010 fu riconosciuta la sua natura di regolatore (Perocchi, Gohil et al. 2010). MICU1 è una proteina di 50 kDa, presenta due domini EF (EF hand) che ne permettono la regolazione calcio dipendente. Il silenziamento del gene dimostra che la sua presenza è fondamentale per l'accumulo di calcio nei mitocondri, ma in sua assenza la matrice mitocondriale presenta, in condizioni basali, una $[Ca^{2+}]$ più elevata, che causa un'aumentata produzione di ROS e induce una maggiore sensibilità della cellula a stimoli apoptotici (Mallilankaraman, Doonan et al. 2012).

La modalità di funzionamento di MICU1 è stata chiarita a seguito dell'identificazione di un suo omologo, MICU2, e della loro reciproca interazione. MICU2 è una proteina di 45 kDa, presenta anch'essa due domini EF e viene considerata un regolatore negativo di MCU poiché la sua overespressione riduce la risposta mitocondriale ad un aumento di calcio citosolico. MICU1 e MICU2 sono presenti nello spazio intermembrana, sono in grado di formare eterodimeri di 95 kDa, legati da ponti disolfuro, e interagiscono con il dominio DIME di MCU (Pendin, Greotti et al. 2015). L'eterodimero è in grado di controllare in maniera fine l'attività del canale in risposta alle concentrazioni citosoliche di calcio percepite dai domini EF. L'attività di MICU2 prevale a basse concentrazioni di calcio nel citosol inibendo il canale, mentre l'azione stimolatoria di MICU1 permette una rapida risposta mitocondriale ad aumenti di calcio generati nel citosol. Questa cooperazione previene un'eccessiva attività di MCU in condizioni fisiologiche, evitando l'induzione di stimoli apoptotici e una produzione di energia non necessaria per la cellula, ma favorisce un'efficiente attivazione del canale a seguito della stimolazione cellulare (Fig. 1.14). MICU1, in assenza di MICU2, è anche in grado di

formare omodimeri che presentano un'attività iperstimolatoria su MCU. Questi due regolatori non sono strettamente correlati soltanto dal punto di vista dell'attività ma anche nei livelli proteici: una diminuzione dell'espressione di MICU1 riduce i livelli di MICU2 (Patron, Checchetto et al. 2014).

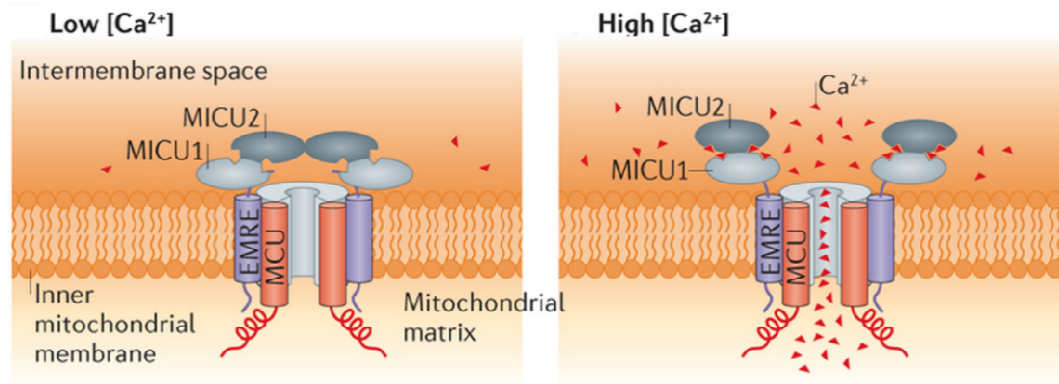


Fig. 1.14 Meccanismo di azione di MICU1 e MICU2 (Kamer and Mootha 2015).

Altro omologo meno noto di MICU1 è MICU3, la cui attività non è ancora ben chiara ma sembra essere espresso a livelli significativi soltanto nel sistema nervoso centrale (Plovanich, Bogorad et al. 2013).

Nel 2012 è stata individuata una nuova proteina, di 35 kDa, con il 50% omologia di sequenza di MCU ma un diverso profilo di espressione, denominata MCUB. Attraverso programmi per la definizione della struttura delle proteine, si è osservato che MCUB non è in grado di formare un canale permeabile al calcio, a causa di specifiche sostituzioni aminoacidiche nella regione del poro. In particolare, la principale differenza sembra essere presente nel dominio DIME dove la sostituzione E256V rende MCUB meno elettronegativo di MCU, influenzando la cinetica e la permeabilità al calcio. MCUB è però in grado di partecipare alla formazione del complesso oligomerico in presenza di MCU, producendo una riduzione della risposta mitocondriale ad un aumento del calcio citosolico, determinando quindi un effetto dominante negativo (Raffaello, De Stefani et al. 2013).

MCUR1 (Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1), è stato identificato nel 2013 e considerato un altro componente del complesso. Questa proteina di 40 kDa, presente nella membrana mitocondriale interna, presenta le porzioni C- ed N-terminale nello spazio intermembrana mentre affaccia per la maggior parte nella matrice. L'overespressione di MCUR1 induce un aumento dell'ingresso di calcio nei mitocondri esclusivamente quando anche MCU è overespresso. Diverse evidenze sperimentali hanno fatto supporre che MCUR1 fosse importante sia per l'apertura del canale che per l'assemblaggio del complesso, nonostante diversi studi ritenessero che MCUR1 fosse coinvolto nella regolazione della fosforilazione ossidativa e nell'attivazione dell'autofagia (Mallilankaraman, Cardenas et al. 2012). Un lavoro di Paupe e collaboratori ha infine recentemente dimostrato che MCUR1 è in realtà un fattore di assemblaggio della Citocromo-C ossidasi e non un regolatore di MCU (Paupe, Prudent et al. 2015).

Infine è stata identificata una proteina di 10 kDa con un solo dominio transmembrana, la cui assenza provoca una totale perdita dell'attività del canale, nonostante la normale espressione ed oligomerizzazione di MCU, ed è stata per questo motivo definita EMRE (Essential MCU Regulator). EMRE sembra essere necessaria per la corretta interazione tra MICU1-MICU2 e MCU, modula quindi la conduttanza del canale regolando l'attività calcio sensibile di MICU1 e MICU2 (Sancak, Markhard et al. 2013).

1.4 Il morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson (PD), dopo la malattia di Alzheimer, rappresenta la più comune malattia neurodegenerativa. Questa patologia progressiva cronica colpisce circa il 2% della popolazione mondiale oltre i 60 anni, percentuale che è destinata ad aumentare nei prossimi anni (Dorsey, Constantinescu et al. 2007).

Le caratteristiche cliniche sono, in primo luogo, difficoltà motorie quali bradichinesia, tremori a riposo, rigidità muscolare e instabilità motoria ma, successivamente, si presentano anche sintomi non motori, come disturbi del sonno, depressione e deficit cognitivo (Dauer and Przedborski 2003; O'Sullivan, Williams et al. 2008). Più di quaranta diverse malattie neurologiche mostrano caratteristiche cliniche di tipo

Parkinsoniano, per questo motivo la diagnosi definitiva di morbo di Parkinson può essere effettuata con certezza soltanto a seguito di autopsia.

Sebbene la neurodegenerazione coinvolge diverse aree del cervello come il nucleo motorio dorsale del vago, il locus coeruleus e il nucleo olfattivo, la principale caratteristica a livello neuropatologico è rappresentata dalla morte selettiva dei neuroni dopaminergici presenti nella Sostanza Nigra (SN) che proiettano allo striato. I sintomi derivano quindi dalla carenza a livello striatale di dopamina, neurotrasmettitore che determina il controllo del movimento corporeo (Braak, Ghebremedhin et al. 2004).

Molto spesso la degenerazione neuronale è accompagnata dalla presenza di inclusioni proteiche intracitoplasmatiche di natura eosinofila, note come corpi di Lewy, il cui ruolo patogenetico è ancora dibattuto. Questi non rappresentano una caratteristica obbligata della malattia e sono assenti in molti casi di PD (Forno 1996).

Nonostante l'eziologia multifattoriale, si possono distinguere una forma sporadica ed una familiare della malattia. La prima rappresenta il 90% dei casi diagnosticati, ed è dovuta a cause non ancora del tutto chiare, la seconda è invece caratterizzata da mutazioni in specifici geni ed è associata soprattutto allo sviluppo di forme giovanili (Gasser 2001; Sulzer 2007). In tutti i casi sporadici, l'età sembra essere un fattore di rischio importante (Rodriguez, Rodriguez-Sabate et al. 2015).

Nonostante l'intenso dibattito sulla causa primaria del Parkinson, è probabile che le disfunzioni molecolari osservate siano strettamente collegate tra loro e avviano un circolo vizioso patogenetico responsabile della progressione della malattia. Nello sviluppo della malattia le principali alterazioni cellulari osservate sono associate allo stress ossidativo, alla degradazione proteica e a disfunzioni mitocondriali, che conducono a fenomeni apoptotici e infiammatori (Fig. 1.15).

Al momento, nonostante alcuni meccanismi patogenetici siano stati identificati, non esiste cura per il morbo di Parkinson e le terapie esistenti si basano principalmente sul trattamento dei sintomi (Savitt, Dawson et al. 2006).

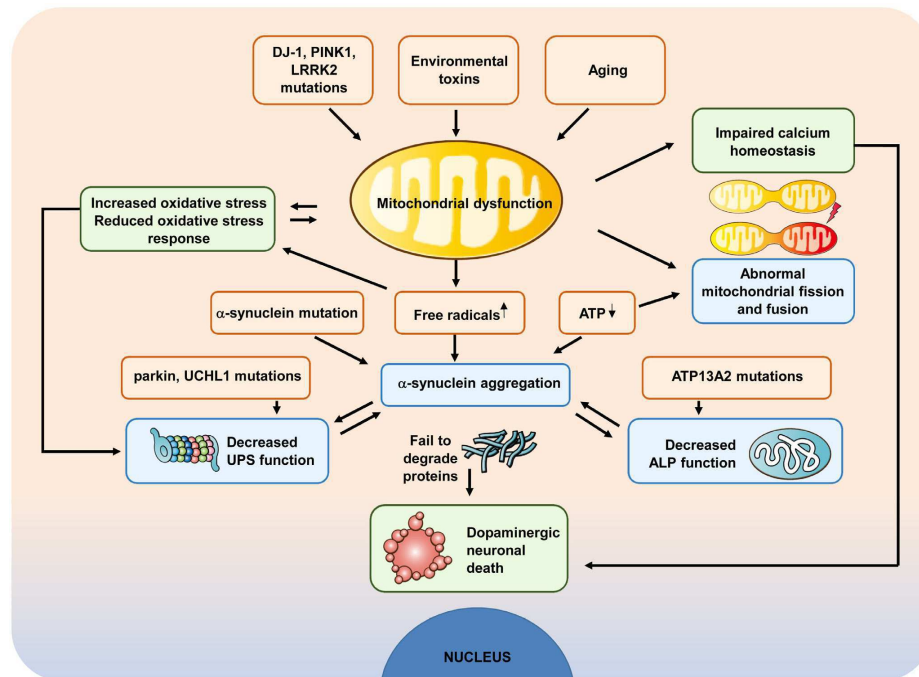


Fig. 1.15 Meccanismi coinvolti nella patogenesi del morbo di Parkinson (Moon and Paek 2015).

Alterazioni nella degradazione proteica

Il morbo di Parkinson, così come altre patologie neurodegenerative legate all'età, è caratterizzato da fenomeni di aggregazione proteica (Ross and Poirier 2004).

I meccanismi di controllo di qualità, che agiscono nel coordinare la sintesi e la degradazione delle proteine, normalmente prevengono la formazione di aggregati intracellulari, ma l'esposizione prolungata a fattori di stress ne possono indurre il fallimento. Sebbene la composizione e la localizzazione degli aggregati proteici differisca da patologia a patologia, la loro presenza è sempre associata a neurotossicità (Powers, Morimoto et al. 2009) e diverse evidenze sperimentali convergono sull'idea che ciò abbia un ruolo nella patogenesi sia dei casi familiari che sporadici di morbo di Parkinson (Fig. 1.16).

All'interno dei corpi di Lewy (LBs) sono state riscontrate proteine ubiquitinate, chaperones e altre componenti del sistema ubiquitina-proteasoma. La presenza, nel cervello dei pazienti di substrati non degradati coniugati all'ubiquitina evidenzia che le proteine danneggiate o mal ripiegate vengono prontamente riconosciute ma non

efficientemente degradate. Ciò ha suggerito che disfunzioni nei sistemi di degradazione proteica giochino un ruolo chiave nel processo neurodegenerativo (Lennox, Lowe et al. 1989; Ii, Ito et al. 1997). Un'ipotesi alternativa è che la formazione di queste inclusioni sia il risultato di un meccanismo di difesa cellulare, necessario per sequestrare le proteine danneggiate o malripiegate presenti nel citosol, supportando l'idea che le specie neurotossiche siano le componenti proteiche solubili e non gli aggregati (Kopito 2000).

L' α -sinucleina, uno dei principali componenti dei LBs, è una proteina abbondante nel cervello ed è espressa principalmente a livello pre-sinaptico, ma la sua funzione fisiologica è ancora dibattuta. Mutazioni puntiformi o duplicazioni nel suo gene, presenti nelle forme familiari di Parkinson, ne favoriscono conformazioni tossiche, propense all'aggregazione, che a loro volta compromettono l'attività dei sistemi di degradazione (Emmanouilidou, Stefanis et al. 2010). Anche nei casi sporadici, sono state osservate inclusioni citoplasmatiche contenenti α -sinucleina ossidata, dimostrando che anche fattori non genetici influiscono sui processi di ripiegamento o aggregazione di questa proteina (Giasson and Lee 2000).

Altri fattori genetici che supportano il coinvolgimento dell'UPS nell'eziologia del Parkinson derivano da mutazioni riscontrate in specifici geni quali Parkin, una E3-ubiquitina ligasi, e UCH-L1, una deubiquitinasi. E' noto che nei soggetti malati questo tipo di attività enzimatiche sono fortemente ridotte a livello dello striato (Kitada, Asakawa et al. 1998; Leroy, Boyer et al. 1998) e l'analisi *post-mortem* ha dimostrato una significativa riduzione dell'attività proteasomica a livello della sostanza nigra (McNaught, Olanow et al. 2001).

Il legame tra il sistema UPS e Parkinson è stato inoltre evidenziato da una serie di studi che dimostrano una diminuzione dell'attività del proteasoma a seguito di esposizione a vari pesticidi e tossine ambientali (rotenone, paraquat, maneb), implicate nell'eziologia dei casi sporadici (Wang, Li et al. 2006). In questi casi la causa dei difetti nell'attività proteolitica non è ancora chiara ma potrebbe essere legata alle alterazioni mitocondriali che determinano un aumento dello stress ossidativo e una ridotta produzione di ATP, da cui l'UPS è dipendente (Cook, Stetler et al. 2012).

L'altro sistema attraverso il quale proteine aberranti possono essere eliminate dalla cellula è rappresentato dalla via autofagica mediata dagli chaperones. Tuttavia, poiché

le proteine all'interno degli aggregati insolubili non possono essere denaturate, così come è bloccata la loro traslocazione nel proteasoma lo è anche l'ingresso nei lisosomi. Per questo motivo è maggiore la probabilità che gli aggregati possano essere eliminati tramite macroautofagia. L'attivazione farmacologica della macroautofagia si è dimostrata in grado di diminuire il numero di aggregati intracellulari e proteggere dalla neurotossicità indotta da forme mutate di α -sinucleina (Ravikumar and Rubinsztein 2004). In alcune condizioni è invece la sua inibizione ad essere protettiva. Probabilmente questo meccanismo di degradazione promuove inizialmente l'eliminazione di proteine danneggiate ma, nel momento in cui la situazione non viene risolta, una persistente attivazione della macroautofagia induce meccanismi apoptotici per l'eliminazione delle cellule irreversibilmente danneggiate (Iwata, Christianson et al. 2005). In ogni caso l'età sembra essere un fattore responsabile del fallimento dei meccanismi autofagici, contribuendo all'accumulo di materiale non digerito nelle cellule attraverso un'inefficiente fusione lisosoma-fagosoma e l'inibizione dell'attività delle idrolasi lisosomiali (Cuervo, Bergamini et al. 2005).

L'accumulo di proteine a livello intracellulare a causa del fallimento dei sistemi di degradazione rappresenta quindi un fattore patogenetico comune ai casi familiari e sporadici di Parkinson.

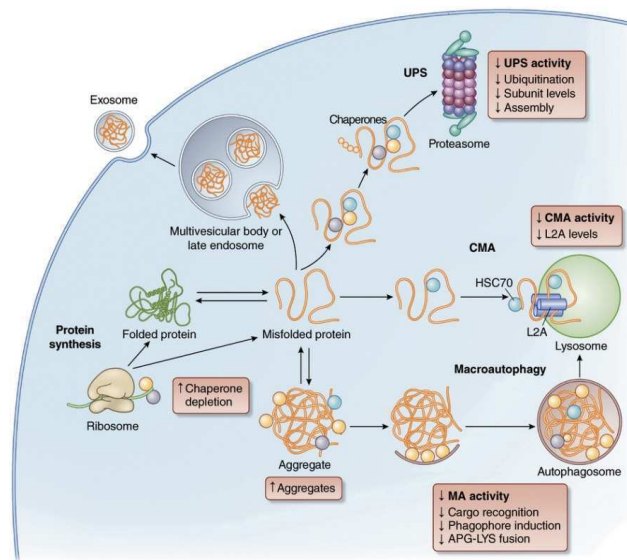


Fig. 1.16 Alterazione dell'omeostasi proteica osservate nel Parkinson (Kaushik and Cuervo 2015).

Alterazioni mitocondriali

I neuroni sono cellule particolarmente dipendenti dall'integrità mitocondriale a causa dell'elevata attività metabolica e delle richieste energetiche necessarie in primo luogo per mantenere i gradienti ionici per la neurotrasmissione. In diversi modelli sperimentali di morbo di Parkinson sono state evidenziate alterazioni mitocondriali principalmente associate alla capacità bioenergetica e allo stress ossidativo (Fig. 1.17) (Celardo, Martins et al. 2013).

In condizioni normali, durante la produzione di energia attraverso la catena respiratoria, può esserci una certa perdita costitutiva di elettroni ad alta energia. Questi reagiscono con l'ossigeno e portano alla formazione di radicali liberi (ROS), specie altamente reattive in grado di produrre ossidazione di proteine, DNA, RNA e perossidazione lipidica. I complessi I e III rappresentano i principali siti di produzione mitocondriale di ROS. La cellula possiede un'ampia gamma di meccanismi per la neutralizzazione dei radicali liberi come la glutatione perossidasi, la catalasi e la superossido dismutasi. Quando il bilancio tra la produzione di radicali liberi e le difese antiossidanti viene perturbato, si produce un accumulo di ROS definito stress ossidativo (Moran, Moreno-Lastres et al. 2012).

Nelle patologie neurodegenerative a insorgenza tardiva una delle cause della sensibilità neuronale deriva da una maggiore produzione di ROS e da una riduzione nella capacità antiossidante delle cellule, associate all'età (Wallace 2005).

Studi *post-mortem* hanno dimostrato che nel Parkinson ci sono evidenze di stress ossidativo caratterizzato da perossidazione lipidica, aumentati livelli di proteine ossidate e di danno al DNA (Seet, Lee et al. 2010). Ciò sembra essere indotto principalmente dall'inibizione della catena respiratoria, il cui blocco induce un aumento del rilascio di elettroni ad alta energia.

L'idea che i mitocondri potessero essere direttamente implicati nella patogenesi del Parkinson, deriva da una scoperta accidentale fatta nel 1983. L'esposizione alla sostanza psicoattiva MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), un inibitore del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, riproduceva le principali caratteristiche cliniche e neuropatologiche della malattia (Langston, Ballard et al. 1983). L'MPTP viene convertito in MPP⁺ dalle cellule gliali e assorbito dai neuroni

dopaminergici attraverso i trasportatori per la dopamina, determinando una forma acuta e permanente di Parkinson con degenerazione dei neuroni striatali.

In maniera simile, altre tossine ambientali associate alle forme sporadiche, come rotenone, paraquat e tricloroetilene, inducono neurodegenerazione dopaminergica interferendo con la funzionalità del complesso I della catena respiratoria (Betarbet, Sherer et al. 2000).

Inoltre l'identificazione dei geni implicati nelle forme familiari ha evidenziato come l'attività delle proteine codificate (α -synucleina, Parkin, DJ-1, Pink1, LRRK2 e HTRA2) è legata direttamente o indirettamente ai mitocondri. I meccanismi d'azione implicati nella patogenesi del Parkinson, su cui convergono queste proteine, coinvolgono non soltanto la bioenergetica ma varie dinamiche mitocondriali tra cui i fenomeni di fissione/fusione, il trasporto, il turnover e la mitofagia. (Borland, Mohanakumar et al. 2009).

Mutazioni nel gene per l' α -synucleina inducono una riduzione delle MAM, quelle strutture derivanti dell'associazione tra mitocondri e reticolo endoplasmatico (Guardia-Laguarta, Area-Gomez et al. 2014) precedentemente menzionate. A livello delle MAM sono presenti diversi enzimi e proteine coinvolti in importanti processi cellulari tra cui la segnalazione mediata dal calcio. Anche Parkin e DJ-1 sembrano essere necessarie per il corretto trasferimento di calcio dal reticolo endoplasmatico ai mitocondri (Cali, Ottolini et al. 2012; Rodriguez-Arribas, Yakhine-Diop et al. 2016).

La capacità tamponante dei mitocondri nei confronti del calcio è particolarmente importante nei neuroni dopaminergici poiché possiedono meccanismi pacemaker autonomi basati sui canali per il calcio di tipo L. L'attività dei canali L, infatti, espone i neuroni a frequenti influssi di calcio e ad una maggiore necessità di ATP per controllarne le concentrazioni citosoliche: una deregolazione di questi meccanismi può indurre un sovraccarico di calcio a livello mitocondriale conducendo all'apertura del PTP e all'apoptosi (Surmeier, Guzman et al. 2011). Un eccesso di calcio a livello mitocondriale è stato inoltre osservato in modelli sperimentali di Parkinson indotti da rotenone (Yadava and Nicholls 2007).

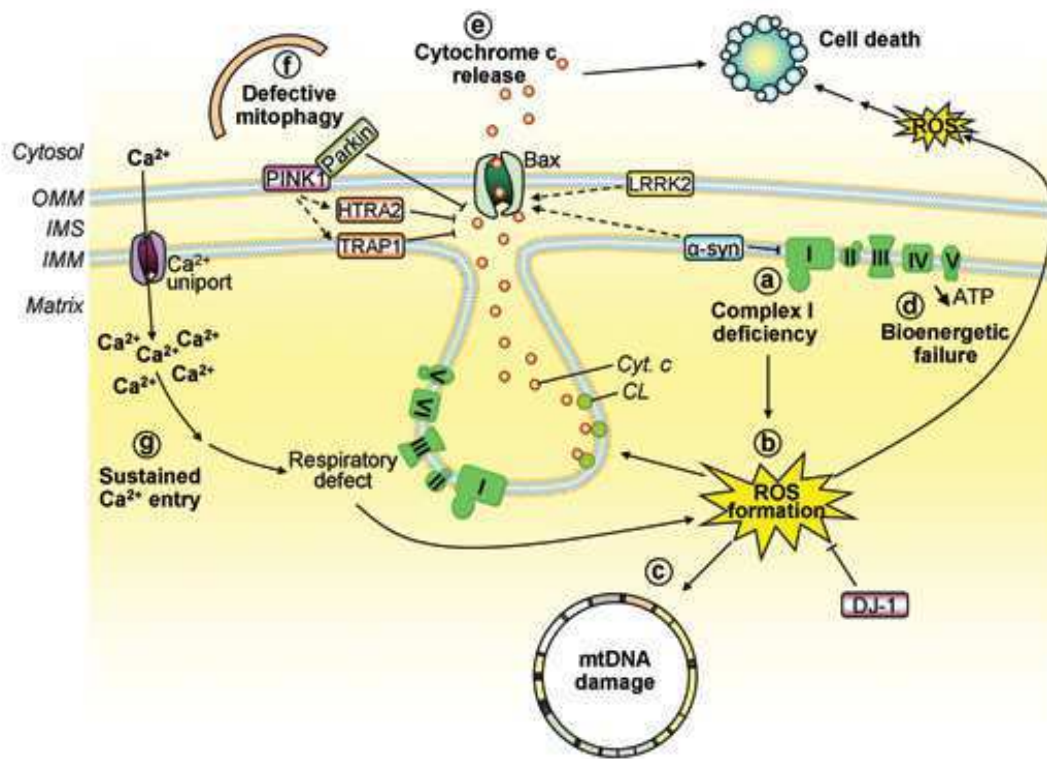


Fig. 1.17 Disfunzioni mitocondriali nel morbo di Parkinson (Perier and Vila 2012).

Parkin

Una forma autosomica recessiva di Parkinson giovanile (AR-JP) fu descritta per la prima volta in Giappone. I pazienti mostravano classici segni di Parkinson prima dei 40 anni con una lenta progressione della patologia (Ishikawa and Tsuji 1996). Il locus responsabile della malattia, presente sul cromosoma 6, fu denominato PARK2 e soltanto successivamente associato all'attività ligasica (Shimura, Hattori et al. 2000).

Come detto in precedenza, l'identificazione di mutazioni nel gene PARK2, codificante per la E3 ubiquitina ligasi citosolica Parkin, in forme familiari di Parkinson indica il coinvolgimento dell'UPS e dei mitocondri nella patogenesi della malattia (Abbas, Lucking et al. 1999).

La proteina Parkin, composta da 465 amminoacidi, appartiene alla famiglia delle RING-between-RING (RBR) E3 ligasi ed è costituita da un canonico dominio di tipo C3HC4 (RING1) seguito da due domini leganti zinco, ricchi in cisteina e istidina (Cys/His-rich Zn-binding domain), una regione tra i domini RING (IBR) e un secondo dominio RING

(RING2) che rappresenta il sito catalitico contenente un residuo di cisteina fondamentale per l'attività dell'enzima. La sequenza amminoacidica contiene inoltre una regione ad elevata omologia con l'ubiquitina all'N-terminale (dominio Ubl), coinvolta nel riconoscimento dei substrati (Wenzel, Lissounov et al. 2011) e due interdomini flessibili di collegamento. Uno di questi è costituito da una sequenza conservata ad α -elica, definita elemento repressore di Parkin (REP) poiché legando il dominio RING1 regola l'attività enzimatica (Fig. 1.18) (Riley, Loughheed et al. 2013).

Più di 120 mutazioni patogenetiche sono diffuse su tutti i domini di Parkin, mettendo in evidenza la funzione critica di ognuno di essi (Cruts, Theuns et al. 2012). Negli ultimi anni, diversi gruppi hanno descritto ad elevata risoluzione la struttura cristallina di alcuni frammenti di Parkin e l'analisi a bassa risoluzione della conformazione dell'intera proteina ne evidenzia un arrangiamento attorcigliato ma compatto (coiled snake), stabilizzato da differenti interazioni idrofobiche (Dove and Klevit 2013). La conoscenza della struttura di Parkin fornisce il razionale per molte delle mutazioni associate al Parkinson: alcune ne compromettono l'integrità strutturale, altre interferiscono con il legame dei substrati o agiscono direttamente sulla catalisi.

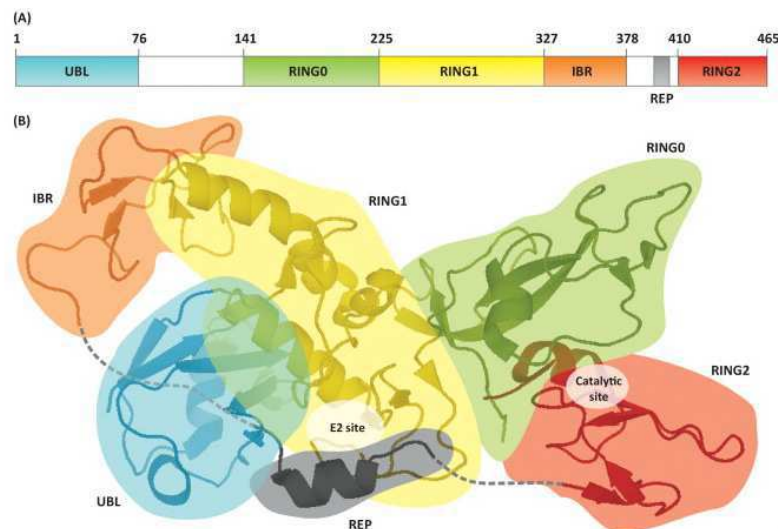


Fig. 1.18 Struttura di Parkin (Winklhofer 2014).

L'attività catalitica di Parkin è controllata da diversi meccanismi di autoinibizione: il primo è mediato da un dominio definito RING0 che è in grado di impedire fisicamente l'accesso al sito catalitico nella regione RING2; l'altro controlla il legame dell'enzima E2 al dominio RING1 attraverso le regioni Ubl e REP (Trempe, Sauve et al. 2013).

Mutazioni puntiformi che distruggono le interazioni del dominio REP e delezioni a livello N-terminale hanno fornito informazioni importanti sui meccanismi di attivazione di Parkin. In particolare il dominio Ubl sembra giocare un ruolo fondamentale, in quanto diverse proteine che legano o agiscono in questa regione sono coinvolte nella regolazione dell'attività di Parkin (Chaugule, Burchell et al. 2011). Come descritto in precedenza, Pink1, una chinasi mitocondriale, agisce a monte di Parkin determinando il suo reclutamento mitocondriale e l'attivazione della mitofagia. E' stato dimostrato che Pink1 fosforila la serina 65 nel dominio Ubl, inducendo l'attivazione di Parkin, ma la mutazione fosfomimetica S65E non è in grado di sostituirla completamente il ruolo (Iguchi, Kujuro et al. 2013). La ricerca di un substrato di collegamento ha portato alla delucidazione del meccanismo. Pink1 è in grado di fosforilare l'ubiquitina nella stessa posizione (ser65) del dominio Ubl, ed è questa ad attivare direttamente Parkin (Fig. 1.18) (Kazlauskaite, Kondapalli et al. 2014).

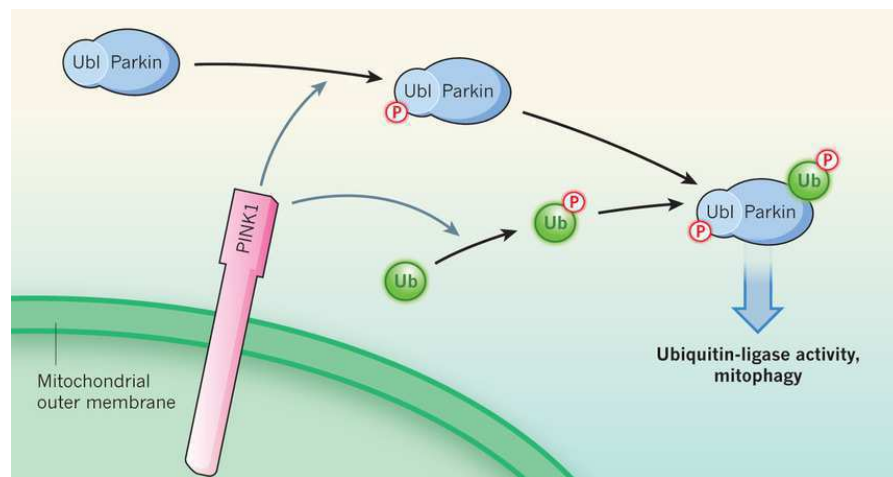


Fig. 1.19 Attivazione di Parkin da parte di Pink1 (Abeliovich 2014).

Parkin svolge inoltre una serie di funzioni al di fuori dell'attivazione della mitofagia. Con Pink1 collabora nel riparare i mitocondri danneggiati dallo stress ossidativo, attraverso la formazione di vescicole (mitochondrial derived vesicles, MDVs) che trasportano le proteine danneggiate ai lisosomi (McLelland, Soubannier et al. 2014). E' inoltre riportato un ruolo di Parkin nel promuovere la sopravvivenza cellulare sebbene i meccanismi non siano ancora del tutto chiari (Ekholm-Reed, Goldberg et al. 2013).

2. Scopo del lavoro

Dai dati presenti in letteratura e discussi in precedenza, risulta evidente il ruolo del complesso dell'uniporto mitocondriale del calcio nel modulare le risposte locali e globali ai segnali mediati dal calcio. Negli ultimi anni, la maggior parte degli sforzi si sono concentrati sull'identificazione delle diverse componenti del complesso e su come queste cooperano per ottenere una fine regolazione, necessaria per il benessere mitocondriale. Nonostante alcuni meccanismi di controllo dell'attività del canale siano stati chiariti, la modalità di regolazione post-traduzionale (importo, ripiegamento, turnover) delle varie componenti del complesso non sono ancora note.

Nel tentativo di ottenere maggiori informazioni, in termini di stabilità e degradazione, sul complesso mitocondriale deputato all'ingresso del calcio, lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'emivita delle varie componenti ed il coinvolgimento del sistema ubiquitina-proteasoma nel loro turnover.

Infine, considerato il ruolo di Parkin nella modulazione della funzione del proteasoma e nella degradazione di specifiche proteine mitocondriali, è stato valutato il suo coinvolgimento nella regolazione delle componenti del complesso MCU e quindi nella risposta mitocondriale a fluttuazioni del calcio citosolico.

3. Materiali e metodi

3.1 Colture cellulari

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule HeLa, linea cellulare di origine umana derivante dal tumore della cervice uterina di Henrietta Lacks. Nel 1951 il ricercatore George Gey si accorse che le cellule prelevate da questo tumore potevano essere mantenute vitali in coltura per lungo tempo, ne isolò una, la moltiplicò e diede inizio ad una linea cellulare, considerata la prima linea umana immortale. Da quel giorno le cellule HeLa si dimostrarono prolifiche nel garantire un uso estensivo nella ricerca scientifica e sono le più comunemente utilizzate (Puck and Marcus 1955).

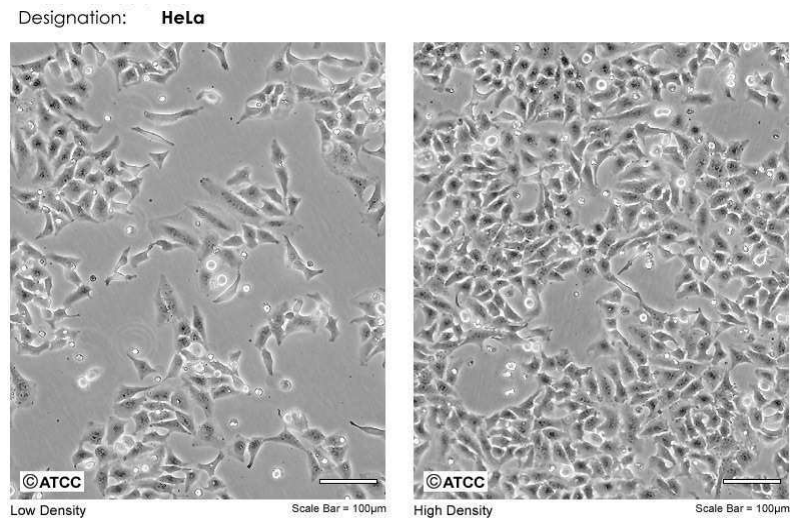


Fig 3.1 Cellule HeLa.

Le cellule sono state cresciute in fiasche per colture cellulari in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) addizionato con: 10% siero fetale bovino (FBS), 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina. Le fiasche sono state mantenute in ambiente umido, alla temperatura di 37°C, ad una atmosfera con il 5% CO₂. Il mezzo è stato cambiato ogni 2-3 giorni e le cellule, raggiunto l'80% di confluenza, sono state subcoltivate regolarmente. Per lo svolgimento degli esperimenti, dopo aver favorito il distacco delle cellule attraverso l'utilizzo di Tripsina/EDTA, queste sono state raccolte, contate e seminate su piastre multipozzetto.

Espressione di proteine esogene

Per l'espressione di proteine esogene sono stati utilizzati vettori plasmidici (pcDNA) contenenti le sequenze codificanti (cDNA) delle proteine di interesse.

L'amplificazione plasmidica avviene in cellule batteriche e la purificazione viene effettuata tramite kit commerciali per MAXI-prep secondo specifiche del produttore (Invitrogen). La quantità e la purezza del DNA ottenuto viene valutata spettrofotometricamente attraverso un NanoDrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

I plasmidi sono stati transfettati mediante il protocollo del calcio fosfato, metodo basato sulla formazione di precipitati di DNA (Kingston, Chen et al. 2001).

Questa tecnica di transfezione prevede l'utilizzo di un buffer, HEPES buffered saline solution (HBS), e di CaCl_2 125 mM. Al DNA diluito in acqua viene aggiunto CaCl_2 freddo, questa soluzione viene poi aggiunta all'HBS in agitazione utilizzando un vortex. 15 minuti sono sufficienti per la formazione dei precipitati, la soluzione viene poi aggiunta al mezzo di coltura ad una diluizione 1:10. Dopo circa 16h di incubazione le cellule vengono ripetutamente lavate con PBS per eliminare i precipitati, viene reintrodotta il mezzo di coltura e sono necessarie 24-48h per osservare l'espressione della proteina. Nei pozzetti di controllo viene comunque transfettata la stessa quantità di plasmide vuoto, privo del gene esogeno.

I geni esogeni utilizzati sono stati: MICU1-HA, MICU2-Flag, MCU-Flag, Parkin-wt, Parkin-G430D, Parkin- Δ Ubl, Pink1.

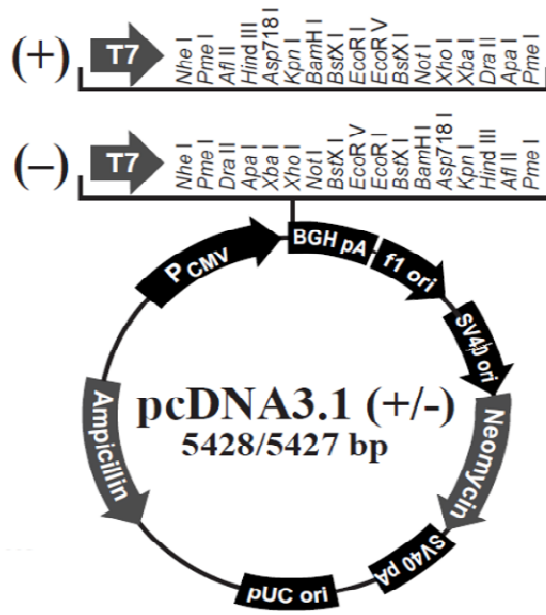


Fig. 3.2 Vettore plasmidico pcDNA 3.1 (Invitrogen).

Esperimenti di emivita

Per l'analisi dell'emivita le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (35 mm²), il giorno successivo è stata effettuata la transfezione con 6 µg di plasmide (pcDNA) contenente il cDNA di MICU1, MICU2 o MCU associata ad una sequenza tag (HA o Flag) che favorisce il riconoscimento rispetto al gene endogeno. La cicloesimmide (CHX) 100 µg/ml (SIGMA) è stata utilizzata per bloccare la sintesi proteica, e l'MG123 10 µM (SIGMA), inibitore del proteasoma, per osservare se la degradazione fosse dipendente dall'UPS. Il mezzo di coltura contenente questi composti è stato preparato e successivamente aggiunto alle cellule. Le cellule sono state lisate dopo differenti tempi di trattamento (0-2-3-4-6h).

I livelli di espressione proteica sono stati determinati tramite tecnica di Western blot e analizzati normalizzandoli per MCU endogeno nel caso di MICU1-HA/MICU2-Flag o per l'actina nel caso di MCU-Flag. Per le forme dimeriche di MICU1-MICU2, nel tampone non è stato utilizzato 1,4-Dithiothreitol (DTT) 25 mM e i campioni sono stati bolliti a 75°C.

Co-espressioni

In alcuni esperimenti sono stati co-espresi i componenti del complesso mitocondriale del calcio e vari costrutti plasmidici di Parkin (wt, G430D, Δ Ubl) o Pink1, clonati nel vettore pcDNA. Il mutante Parkin-G430D presenta un acido aspartico al posto di una glicina nella posizione 430 della sequenza: questa mutazione potrebbe influenzare l'attività E3-ligasica. Parkin- Δ Ubl rappresenta, invece, un mutante troncato del dominio N-terminale Ubl (Ubiquitin Like Domain) della proteina, noto per possedere un ruolo di regolazione dell'attività di Parkin. In entrambe le regioni sono state riscontrate mutazioni patologiche nel Parkinson (Abbas, Lucking et al. 1999).

Anche negli esperimenti di co-espressione le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti, il giorno successivo è stata effettuata la co-transfezione di 3 μ g di plasmide (pcDNA) contenente il cDNA di MICU1-HA, MICU2-Flag o MCU-Flag più 3 μ g di plasmide contenente il cDNA di Parkin, delle sue forme mutate o di Pink1.

Poiché Parkin viene richiamato ai mitocondri a seguito di depolarizzazione (Fig. 3.3), è stato effettuato un trattamento con un agente disaccoppiante (CCCP, Sigma) disciolto ad una concentrazione di 10 μ M per 2 ore nel mezzo di coltura prima di lisare le cellule.

La presenza delle proteine overesprese è stata osservata tramite Western blot. Per analizzare il comportamento delle forme dimeriche di MICU1-MICU2, nel tampone non è stato utilizzato 1,4-Dithiothreitol (DTT) 25 mM e i campioni sono stati bolliti a 75°C.

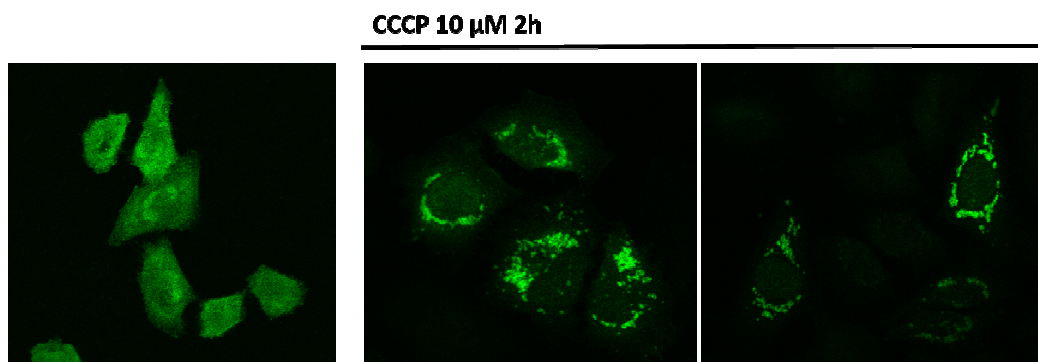


Fig. 3.3 Localizzazione mitocondriale di Parkin dopo trattamento con CCCP.

3.2 Western Blot

L'espressione proteica è stata valutata impiegando metodiche di SDS-PAGE e procedure standard di Western blotting. In breve, dopo i trattamenti, le cellule state raccolte e centrifugate. Il pellet è stato quindi lisato a 4°C utilizzando un tampone di lisi (RIPA buffer) contenente: 150 mM NaCl, 1% Triton, 1% Na-deossicolato, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8, addizionato con inibitori di proteasi e fosfatasi (Roche).

I nuclei ed i detriti cellulari non lisati sono stati rimossi mediante centrifugazione a 16000 g per 10 minuti a 4°C. La frazione citoplasmatica (surnatante) è stata usata per l'analisi in western blot. La determinazione del contenuto proteico dei campioni è stata condotta secondo il metodo della BCA (bicinchoninic acid assay). Uguali quantità di proteine (20-30µg) sono state solubilizzate nel tampone Laemmli 4X con l'aggiunta di DTT (1,4-Dithiothreitol) come agente denaturante, quindi bollite per 10 minuti e analizzate mediante SDS-PAGE (poliacrilammide in gradiente 4-12%) in presenza di sodio dodecilsolfato 0.1% (SDS-PAGE). Le proteine così separate sono state trasferite ad un filtro di nitrocellulosa, bloccate in latte in polvere privo di grassi sciolto in PBS al 5% ed incubate a 4°C tutta la notte con gli anticorpi primari (α HA, α FLAG, α MCU, α Parkin, 1:1000). Le membrane sono state quindi incubate 1 ora a temperatura ambiente con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi. Le bande immunomarcate sono state visualizzate a seguito dell'aggiunta del substrato enzimatico (ECL, Thermo Scientific) che determina la produzione di chemiluminescenza. Le immagini sono state raccolte impressionando lastre fotografiche e sono state analizzate mediante densitometria con il programma ImageJ.

3.3 PCR mutagenesi

Per poter analizzare il ruolo di specifiche lisine (K) all'interno della sequenza di MICU1 sono stati creati dei mutanti in cui sono state sostituite con arginine (R) attraverso un protocollo di mutagenesi tramite PCR (Makarova, Kamberov et al. 2000). Per fare ciò sono stati costruiti primers di PCR (circa 20 coppie di basi) esattamente complementare alla regione in cui è presente il sito da mutare, contenenti la mutazione nel centro. Non è necessaria la costruzione del primer reverse poiché il protocollo prevede l'amplificazione di tutto il vettore plasmidico contenente il gene

MICU1-HA. Circa 300 ng di plasmide sono stati sottoposti a PCR utilizzando una DNA-Polimerasi ad alta efficienza (Pfu), il protocollo prevede: 3' 95° per la denaturazione, 18 cicli di 30" 95°, 1' 60°, 15' 68°. Il prodotto di PCR ottenuto viene sottoposto a trattamento con l'enzima DpnI per un'ora e mezza a 37° in modo da degradare il filamento metilato, corrispondente al filamento stampo (MICU1-HA wt). Il plasmide ottenuto è stato utilizzato per trasformare batteri competenti su un terreno contenente la stessa resistenza presente nel plasmide. Dalle colonie ottenute è stato estratto il DNA plasmidico e, tramite sequenziamento, è stata controllata la sequenza per verificare la presenza della mutazione. I plasmidi corretti sono stati utilizzati per esperimenti di emivita come descritto in precedenza.

3.4 Immunoprecipitazioni (IP)

Per le immunoprecipitazioni sono stati utilizzati due protocolli parzialmente differenti. In entrambi sono state sfruttate biglie di agarosio e almeno 500 µg di lisato proteico ottenuto con un tampone di lisi contenente: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% DDM, addizionato con inibitori di proteasi e fosfatasi (Roche). L'immunocomplesso viene successivamente recuperato dall'associazione con biglie attraverso l'aggiunta di Laemmli 2X e bollitura a 95°C. L'aggiunta di 1,4-Dithiothreitol (DTT) come agente denaturante permette di identificare tramite Western blot le diverse componenti proteiche dell'immunoprecipitato.

- IP MICU1-Ub: per questa immunoprecipitazione è stata utilizzata una resina di agarosio associata ad un anticorpo specifico per l'Ubiquitina (Tandem Ubiquitin Binding Entity, TUBE, Tebu Bio). Cellule HeLa transfettate con MICU1-HA sono state trattate per 2h con l'inibitore del proteasoma MG123 10 µM e successivamente raccolte. Almeno 500 µg di lisato proteico sono stati incubati per tutta la notte con 40 µl di resina, in agitazione a 4°C. Il giorno successivo, dopo diversi lavaggi in PBS, l'immunocomplesso è stato recuperato attraverso bollitura in Laemmli buffer. L'aggiunta di DTT come agente denaturante ha permesso di identificare tramite Western blot le diverse componenti proteiche dell'immunoprecipitato.

- IP MICU1-Parkin: per questa immunoprecipitazione è stata utilizzato un protocollo in cui avviene prima la formazione del complesso proteina-Ab e soltanto successivamente il legame con biglie di sefariosio rivestite di proteina G (sef.G). Cellule HeLa transfettate con MICU1-ha, Parkin o entrambi sono state trattate overnight con l'inibitore del proteasoma MG123 10 μ M e successivamente raccolte. Almeno 500 μ g lisato proteico sono stati incubati per tutta la notte con 4 μ g di Ab per Parkin (PRK8), in agitazione a 4°C. Il giorno successivo è stata aggiunta la resina (40 μ l) ai campioni e incubata per 3h a 4°C. Dopo diversi lavaggi in una soluzione 50% tampone di lisi in PBS, l'immunocomplesso è stato recuperato attraverso bollitura in Laemmli buffer. L'aggiunta di DTT come agente denaturante ha permesso di identificare tramite Western blot le diverse componenti proteiche dell'immunoprecipitato.

I lisati non soggetti a immunoprecipitazione (lisato totale) e le proteine immunoprecipitate sono state analizzate tramite Western blot.

3.5 Misurazione del calcio mitocondriale

Per l'analisi dei livelli mitocondriali di calcio è stato utilizzato un metodo basato sulla bioluminescenza, descritto brevemente di seguito. La sonda proteica sensibile al calcio Aequorina, a seguito della ricostituzione con il suo substrato celenterazina, reagisce irreversibilmente al legame del calcio emettendo fotoni, rilevabili attraverso uno spettrofotometro (Brini 2008). Per monitorare il calcio nei mitocondri è stata utilizzata un'Aequorina con localizzazione mitocondriale, a bassa affinità (mtAeqMut), transfettata nelle cellule insieme ai costrutti indicati.

Cellule HeLa sono seminate in piastre da 6 pozzetti, il giorno successivo viene effettuata la co-transfezione di 3 μ g di plasmide (pcDNA) contenente la sequenza del gene di MICU1-HA, MICU2-Flag o MCU-Flag, 3 μ g di plasmide contenente la sequenza genica di Parkin-wt o del mutante Δ Ubl più 1 μ g di plasmide contenente la sequenza del gene per l'Aequorina. Il giorno precedente l'esperimento le cellule sono state staccate con tripsina e trasferite su una piastra da 96 pozzetti. Prima dell'analisi le cellule sono state sottoposte a ricostituzione con 5 μ M celenterazina per 2h a 37°C in

una soluzione extracellulare contenente: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 1 mM MgSO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5.5 mM glucosio pH 7.4. A seguito delle 2h le cellule sono state lavate nella stessa soluzione, priva di celenterazina, e la piastra viene introdotta uno spettrofotometro dotato di un sistema di pompe di infusione (PerkinElmer EnVision). Il protocollo di analisi prevede l'analisi della bioluminescenza per 1 minuto: l'aggiunta di Istamina 100 μM attiva i transienti di calcio e quindi induce una risposta mitocondriale. Successivamente una soluzione ipotonica, ricca in calcio (10 mM in H₂O), contenente digitonina 100 mM viene introdotta nei pozzetti per saturare l'Aequorina rimanente (Ottolini, Cali et al. 2014). I dati sono stati analizzati e calibrati in modo tale da ottenere dai valori di assorbanza le variazioni mitocondriali nella concentrazione di calcio.

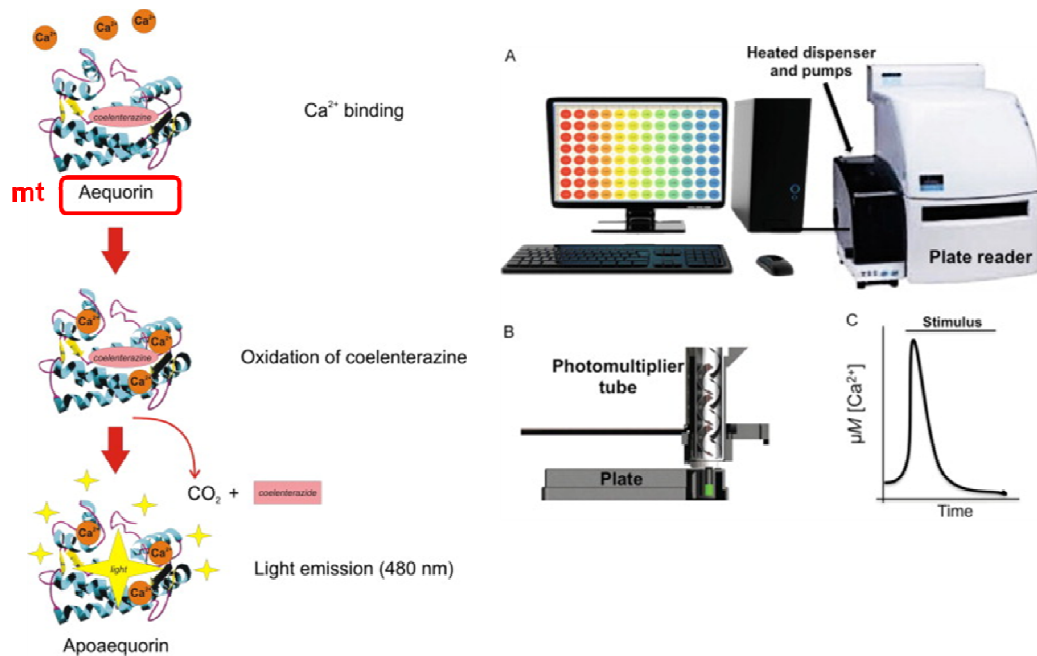


Fig. 3.4 Metodo per la misurazione del calcio mitocondriale (Brini 2008; Ottolini, Cali et al. 2014).

4. Risultati

4.1 Analisi dell'emivita dei regolatori dell'uniporter mitocondriale del calcio

Come descritto nei metodi, per poter studiare il turnover delle componenti del complesso MCU, le cellule transfettate sono state sottoposte a trattamento con CHX (100 µg/ml) per diversi periodi di tempo.

Attraverso il blocco della sintesi proteica possiamo analizzare, tramite Western blot, il decadimento temporale delle proteine di interesse. Questo ci restituisce informazioni relative ai processi della loro degradazione e ci permette di stimare il loro tempo di permanenza medio (emivita) nella cellula. Il confronto è stato effettuato rispetto ai livelli proteici cellulari rilevati al tempo 0 (t0) prima dell'inizio del trattamento con CHX. A seguito di overespressione nelle cellule HeLa, i livelli proteici di MCU-Flag, la proteina canale, rimanevano sostanzialmente inalterati dopo 6 ore e fino a 48 h di trattamento con CHX (Fig. 4.1).

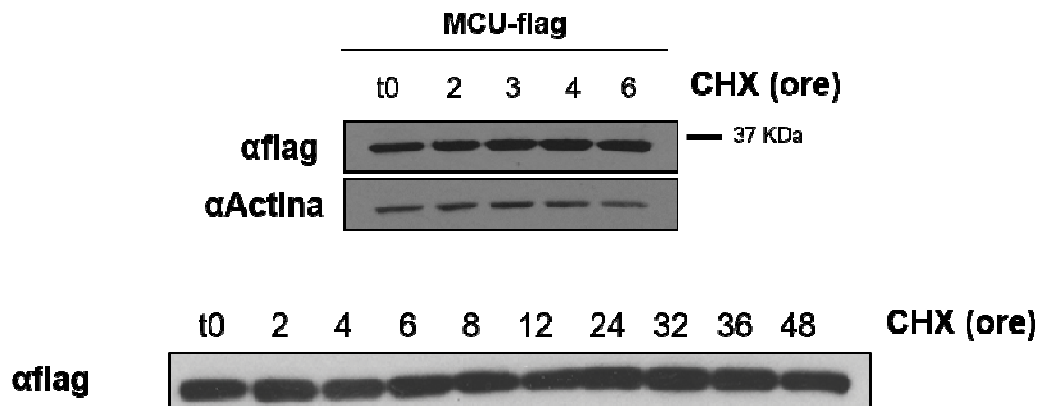


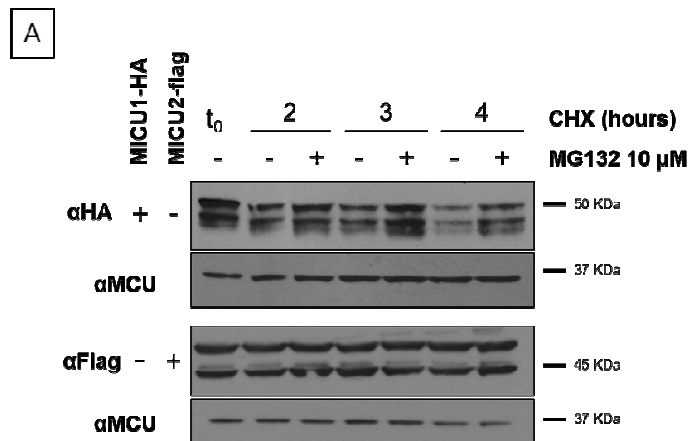
Fig.4.1 Emivita di MCU

Cellule HeLa sono state transfettate con MCU-Flag, dopo 24h le cellule vengono trattate con cicloesimmide 100 µg/ml e poi lisate per i tempi indicati. Il t0 (condizione basale) è stata raccolta appena prima dell'inizio del trattamento. Il lisato proteico è stato sottoposto a Western blot e analizzato con anticorpo anti-Flag, l'actina è stata utilizzata come normalizzatore. L'immagine rappresentativa di Western blot mostra l'emivita di MCU a tempi brevi e più lunghi.

Quando MICU1-HA e MICU2-Flag sono overespresso nelle cellule HeLa, gli anticorpi utilizzati per i Western blot evidenziano più bande all'altezza di 50 kDa (Fig. 4.2 A). Per entrambi i regolatori la banda più alta corrisponde alla forma non processata della proteina, contenente la sequenza di localizzazione mitocondriale a livello N-terminale. Questa è presente finché le proteine si trovano nel citosol e viene tagliata via, da peptidasi mitocondriali, dopo l'ingresso nei mitocondri.

A seguito del trattamento con CHX, l'analisi densitometrica delle bande mostra una significativa diminuzione dei livelli proteici di MICU-HA già dopo 2 ore, mentre i livelli di MICU2-Flag rimangono stabili rispetto al basale per tutto il periodo di osservazione (fino a 4 ore; Fig. 4.2 B-C). Per valutare se il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) avesse un ruolo nella degradazione dei regolatori di MCU, è stato aggiunto al mezzo contenente CHX un inibitore del proteasoma, l'MG132, alla concentrazione di 10 µM, e le proteine sono state raccolte come in precedenza.

Dall'analisi delle immagini è emerso che nel caso di MICU1-HA c'è stata una significativa riduzione della degradazione proteica a 2, 3 e 4 ore rispetto alle cellule trattate esclusivamente con CHX per gli stessi tempi (Fig. 4.2 B).



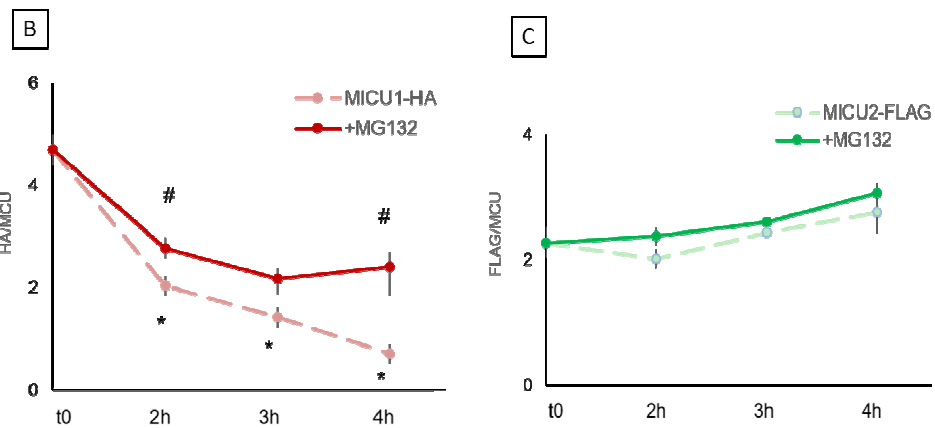


Fig 4.2 Emivita di MICU1 e MICU2

Cellule HeLa sono state transfettate con MICU1-HA o MICU2-Flag. Dopo 24h le cellule vengono trattate con cicloesimide 100 $\mu\text{g/ml}$ +/- MG132 10 μM e poi lisate secondo i tempi indicati. Il t0 (condizione basale) è stata raccolta appena prima dell'inizio del trattamento. Il lisato proteico è stato sottoposto a Western blot e analizzato con anticorpi anti-HA e anti-Flag, MCU è stato utilizzato come normalizzatore.

A L'immagine rappresentativa di Western blot mostra l'emivita di MICU1 e MICU2 in presenza o meno di MG132. **B-C** Analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati su MCU. Ogni punto rappresenta la media +/- S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. (Student's t-test * $p < 0.05$ versus t0; # $p < 0.05$ versus i rispettivi punti non trattati con MG132).

Successivamente è stato analizzato il comportamento di MICU1-HA e MICU2-Flag in condizioni di co-espressione in cellule HeLa.

Osservando le forme monomeriche dalle immagini di Western blot si nota, in tutti gli esperimenti, un aumento nella quantità relativa della banda più bassa di entrambi i regolatori, ciò permette di ipotizzare una maggiore localizzazione mitocondriale quando sia MICU1 che MICU2 sono overespressi (Fig.4.3 A).

L'analisi quantitativa dei livelli proteici rispetto al basale (t0) ha mostrato una protezione dei regolatori dalla degradazione e nessun effetto del trattamento con MG132 (Fig.4.4 B-C).

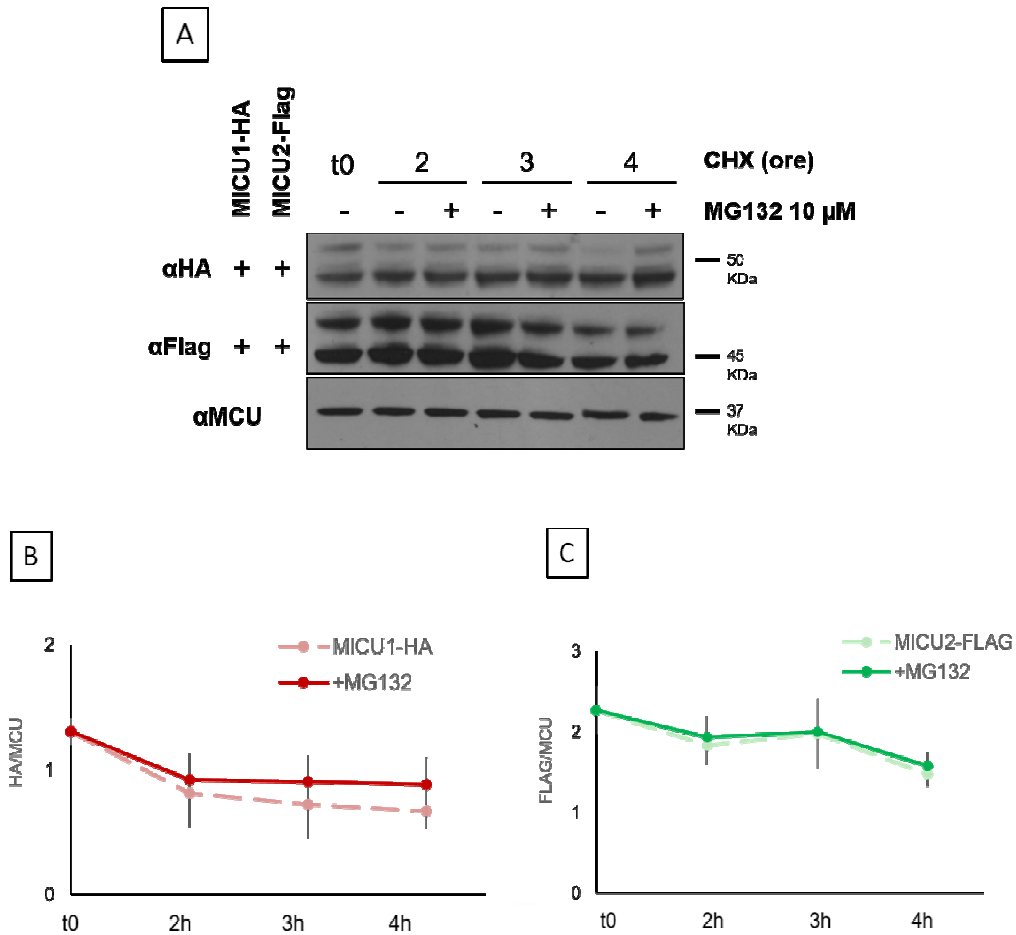


Fig. 4.3 Emivita di MICU1 e MICU2 quando co-espressi

Cellule HeLa sono state transfettate con MICU1-HA+MICU2-Flag. Dopo 24h le cellule vengono trattate con cicloesimide 100 μ g/ml +/- MG132 10 μ M e poi lisate secondo i tempi indicati. Il t0 (condizione basale) è stata raccolta appena prima dell'inizio del trattamento. Il lisato proteico è stato sottoposto a Western blot e analizzato con anticorpi anti-HA e anti-Flag, MCU è stato utilizzato come normalizzatore.

A L'immagine rappresentativa di Western blot mostra l'emivita di MICU1 e MICU2, quando co-espressi, in presenza o meno di MG132. **B-C** Analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati su MCU. Ogni punto rappresenta la media +/- S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti.

Utilizzando condizioni non denaturanti è stato possibile osservare la forma dimerica MICU1-HA-MICU2-Flag, intorno ai 90 kDa.

L'analisi densitometrica delle bande mette in evidenza che il dimero si riduce significativamente a 3 e 4 ore di trattamento con cicloesimide ma l'aggiunta dell'MG132 non è in grado di prolungarne l'emivita (Fig. 4.4).

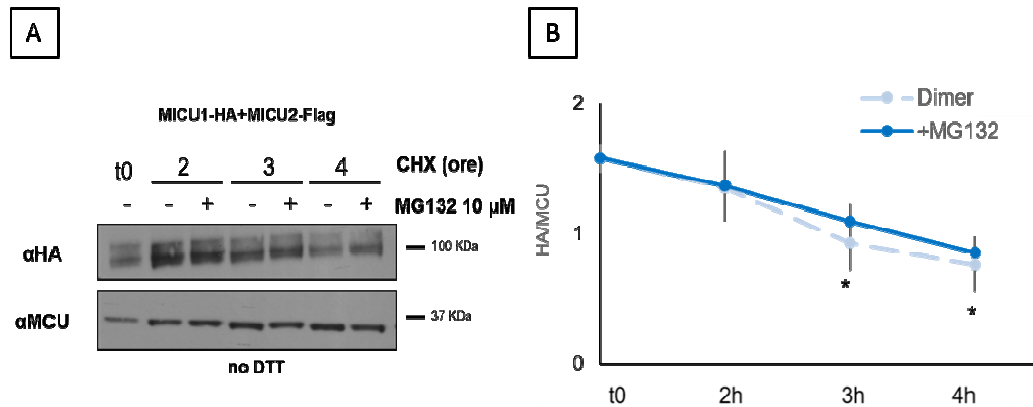


Fig. 4.4 Emivita del dimero

Cellule HeLa sono state transfettate con MICU1-HA+MICU2-Flag. Dopo 24h le cellule vengono trattate con cicloesimide 100 μg/ml +/- MG132 10 μM e poi lisate secondo i tempi indicati. Il t0 (condizione basale) è stata raccolta appena prima dell'inizio del trattamento. Il lisato proteico è stato sottoposto a Western blot e analizzato con anticorpo anti-HA in assenza di DTT, MCU è stato utilizzato come normalizzatore.

A L'immagine rappresentativa di Western blot mostra l'emivita del dimero in presenza o meno di MG132.

B Analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati su MCU. Ogni punto rappresenta la media +/- S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. (Student's t-test * p<0.05 versus t0).

4.2 Ubiquitinazione di MICU1

La prima tappa per la degradazione attraverso l'UPS è rappresentata dal legame di catene di poli-ubiquitina alle proteine. Il legame con il substrato avviene su lisine presenti nella sequenza proteica. Dai dati derivanti dall'analisi dell'emivita di MICU1-HA la via del proteasoma sembra essere coinvolto nella sua regolazione, quindi, attraverso esperimenti di immunoprecipitazione, abbiamo verificato se questa proteina venisse ubiquitinata.

Come si può osservare dalle immagini di Western blot del lisato totale, i livelli basali di MICU1-HA sono aumentati dal trattamento con MG132 anche in assenza di blocco della sintesi proteica, ciò sostiene ulteriormente il coinvolgimento dell'UPS. Utilizzando un anticorpo per l'ubiquitina (αUb) è stato inoltre possibile confermare che il trattamento con l'inibitore del proteasoma aumenta la quantità totale di proteine ubiquitinate sia nelle cellule transfettate con pcDNA che con MICU1-HA.

Nell'immunoprecipitato l'anticorpo per il tag (α HA), utilizzato per osservare il complesso MICU1-Ub, identifica una specifica banda intorno a 50 kDa nei gruppi che overesprimono MICU1-HA. L'immunoprecipitazione conferma quindi l'associazione di MICU1 con l'ubiquitina (Fig.4.5).

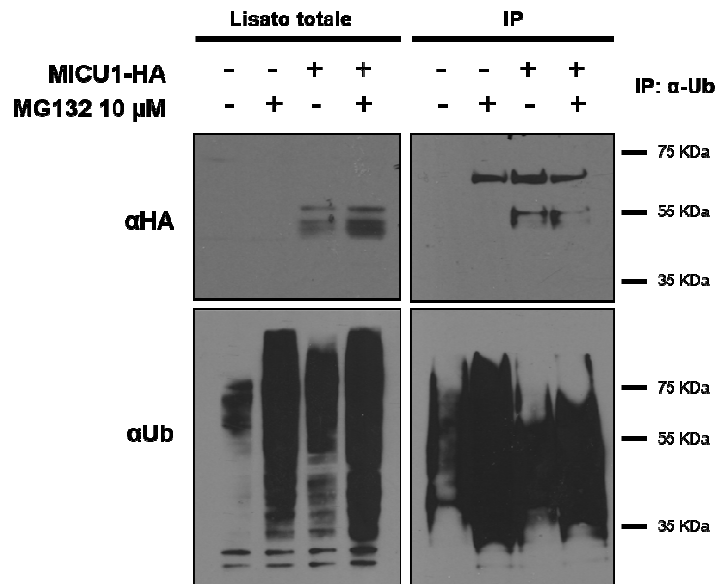


Fig. 4.5 Ubiquitinazione di MICU1

Cellule HeLa sono state transfettate con MICU1-HA o pcDNA come controllo. Per aumentare la quantità di proteine ubiquitinate è stato effettuato un trattamento di 2h con MG132 10 μ M. L'ubiquitina (Ub) è stata immunoprecipitata dal lisato totale tramite una resina di agarosio associata ad un anticorpo specifico per l'Ubiquitina (Tandem Ubiquitin Binding Entity, TUBE, Tebu Bio). Al fine di ricercare MICU1 tra le proteine immunoprecipitate è stato utilizzato un anticorpo anti HA.

4.3 Analisi del ruolo di alcune lisine di MICU1

Dati di spettrometria di massa predicono l'ubiquitinazione di MICU1 ma la sua sequenza amminoacidica contiene più di 30 lisine a cui si potrebbe legare l'ubiquitina (Wagner, Beli et al. 2011).

Per cercare di individuare la lisina responsabile dell'indirizzamento di MICU1 alla degradazione, abbiamo scelto, sulla base di un'analisi preliminare bioinformatica, due

dei siti a maggiore probabilità di ubiquitinazione e attraverso una PCR mutagenesi abbiamo creato dei mutanti sostituendo le lisine predette con arginine.

I costrutti contenenti le sequenze mutate di MICU1 sono stati transfettati in cellule HeLa e la valutazione dell'emivita delle proteine risultanti è stata valutata attraverso il trattamento con CHX, come descritto in precedenza. Dall'analisi dei Western blot nessuna delle lisine prese in considerazione sembrerebbe essere rilevante ai fini della degradazione ubiquitina-dipendente di MICU1-HA (Fig. 4.6).

Sono in corso di svolgimento esperimenti mirati a verificare il coinvolgimento di altre lisine mediante l'utilizzo di costrutti esperimenti MICU1-HA con una o più lisine mutate.

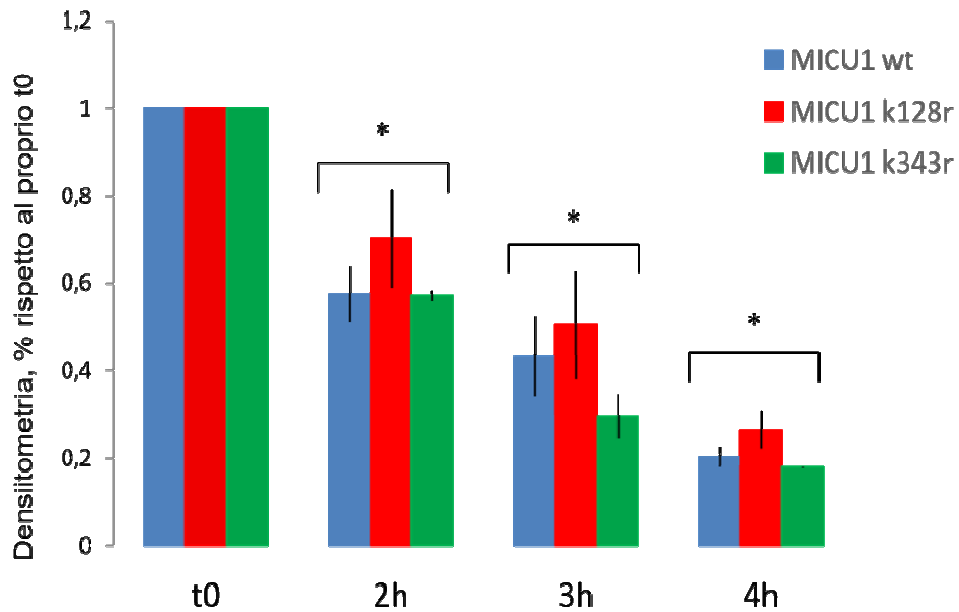


Fig. 4.6 Emivita dei mutanti k→r di MICU1

Cellule HeLa sono state transfettate con MICU1-HA, MICU1-HA k128r o MICU1-HA k343r. Dopo 24h le cellule vengono trattate con cicloesimide 100 µg/ml e poi lisate secondo i tempi indicati. Il t0 (condizione basale) è stata raccolta appena prima dell'inizio del trattamento. Il lisato proteico è stato sottoposto a Western blot e analizzato con anticorpo anti-HA. MCU è stato utilizzato come normalizzatore. L'analisi densitometrica mostra i livelli proteici normalizzati su MCU e riportati in percentuale rispetto al t0. Ogni punto rappresenta la media +/- S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. (Student's t-test * p<0.05 versus t0)

4.4 Modulazione Parkin-dipendente dei livelli proteici dei regolatori di MCU

Il meccanismo di ubiquitinazione di una proteina prevede il coinvolgimento di 3 enzimi, denominati E1-E2-E3. L'ultimo di questi è una ligasi che permette la traslocazione dell'ubiquitina dall'enzima E2 alla lisina sulla proteina di interesse. Tra le E3 ligasi note per avere un ruolo mitocondriale, è presente Parkin, le cui mutazioni sono coinvolte nell'eziologia delle forme giovanili di Parkinson.

Allo scopo di indagare il ruolo di Parkin nella regolazione del complesso dell'uniporto mitocondriale del calcio, abbiamo effettuato esperimenti di co-transfezione in cui diversi costrutti di Parkin (wt o mutanti) venivano overespressi in associazione alle varie componenti del complesso. Successivamente sono stati effettuati analisi di Western blot sulle proteine ottenute dai lisati totali.

Le immagini mostrano che nel caso di MCU, né Parkin-wt né alcuno dei mutanti è in grado di alterarne i livelli proteici (Fig. 4.7).

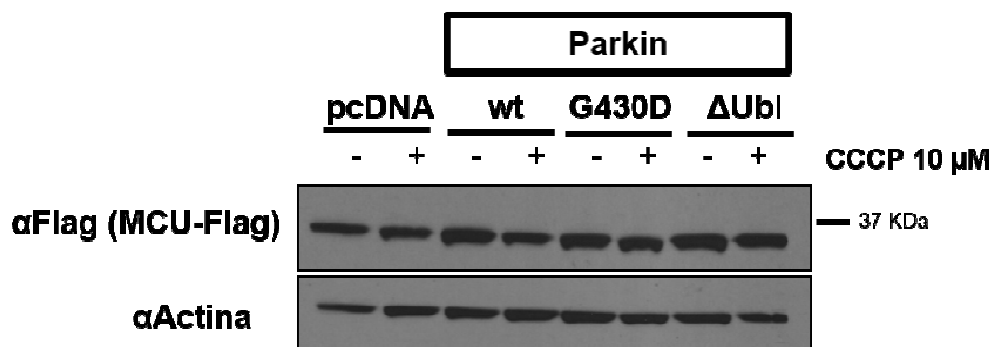


Fig. 4.7 Regolazione Parkin-dipendente dei livelli proteici di MCU

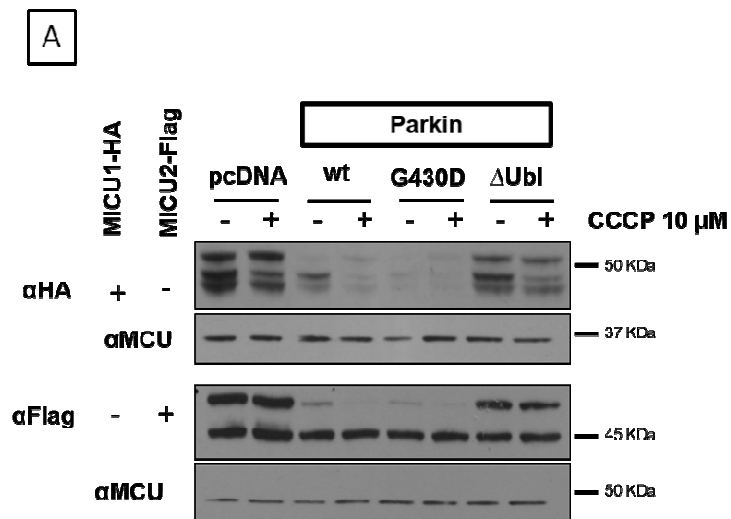
Cellule HeLa sono state transfettate con MCU-Flag e diversi costrutti di Parkin come indicato. Dopo 24h le cellule vengono trattate con CCCP 10 μ M per 2h e poi lisate. Il lisato proteico è stato sottoposto a western blot e analizzato con anticorpo anti-Flag, l'actina è stata utilizzata come normalizzatore.

L'immagine rappresentativa di Western blot mostra l'effetto dei vari costrutti di Parkin sui livelli proteici di MCU in presenza o meno di CCCP.

L'analisi dei livelli di MICU1-HA e MICU2-Flag, quando singolarmente overespressi, evidenzia invece una significativa riduzione dei livelli proteici in presenza di Parkin-wt o del mutante G430D, ma non quando viene overespressa la forma troncata Δ Ubl che non è in grado di influenzarne significativamente i livelli di espressione (Fig. 4.8 B-C).

Dall'analisi dei blot abbiamo notato la scomparsa prevalente della banda più alta che corrisponde alla forma citosolica e non processata dei regolatori, contenente la sequenza di localizzazione mitocondriale (Fig. 4.8 A).

E' dimostrato che Parkin viene richiamato ai mitocondri a seguito di un'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale (vedi Fig. 3.3). Per promuovere quindi la localizzazione di Parkin a livello di questo organello abbiamo utilizzato un agente disaccoppiante, il CCCP (alla concentrazione di 10 μ M), che induce depolarizzazione mitocondriale. Il trattamento per 2 ore non ha indotto però una significativa variazione dell'influenza di Parkin sui livelli proteici di MICU1-HA e MICU2-Flag (Fig. 4.8 B-C).



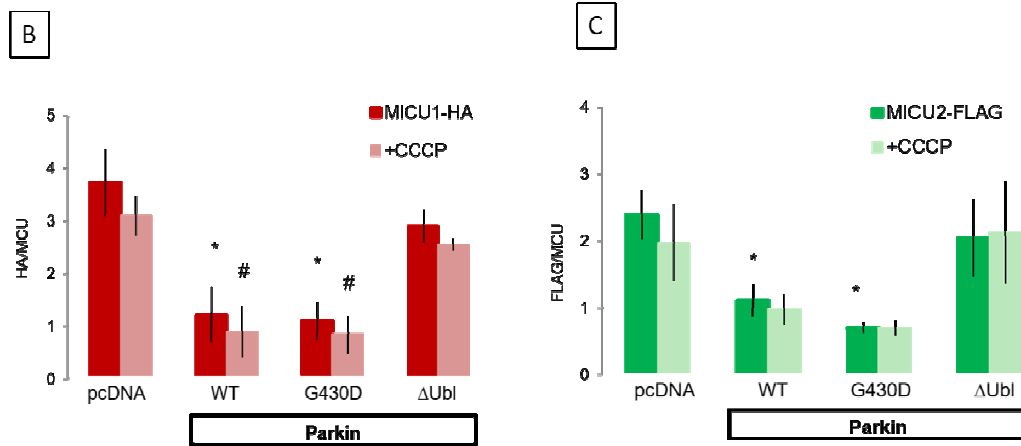


Fig. 4.8 Regolazione Parkin-dipendente dei livelli proteici di MICU1 e MICU2

Cellule HeLa sono state transfettate con MICU1-HA o MICU2-Flag e diversi costrutti di Parkin come indicato. Dopo 24h le cellule vengono trattate con CCCP 10 μ M per 2h e poi lisate. Il lisato proteico è stato sottoposto a Western blot e analizzato con anticorpo anti-HA o anti-Flag, MCU è stato utilizzato come normalizzatore.

A L'immagine rappresentativa di Western blot mostra l'effetto dei diversi costrutti di Parkin sui livelli proteici di MICU1 e MICU2 in presenza o meno di CCCP. **B-C** Analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati su MCU. Ogni barra rappresenta la media \pm S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. (Student's t-test * $p < 0.05$ versus pcDNA; # $p < 0.05$ versus pcDNA+CCCP).

A seguito di co-espressione di MICU1-HA e MICU2-Flag, si può osservare una riduzione dell'effetto di Parkin-wt e del mutante G430D sia nei confronti dei monomeri che del dimero, visualizzato in condizioni non denaturanti. La presenza del costrutto Δ Ubl-Parkin non induceva una variazione dei livelli basali in nessuna condizione (Fig. 4.9).

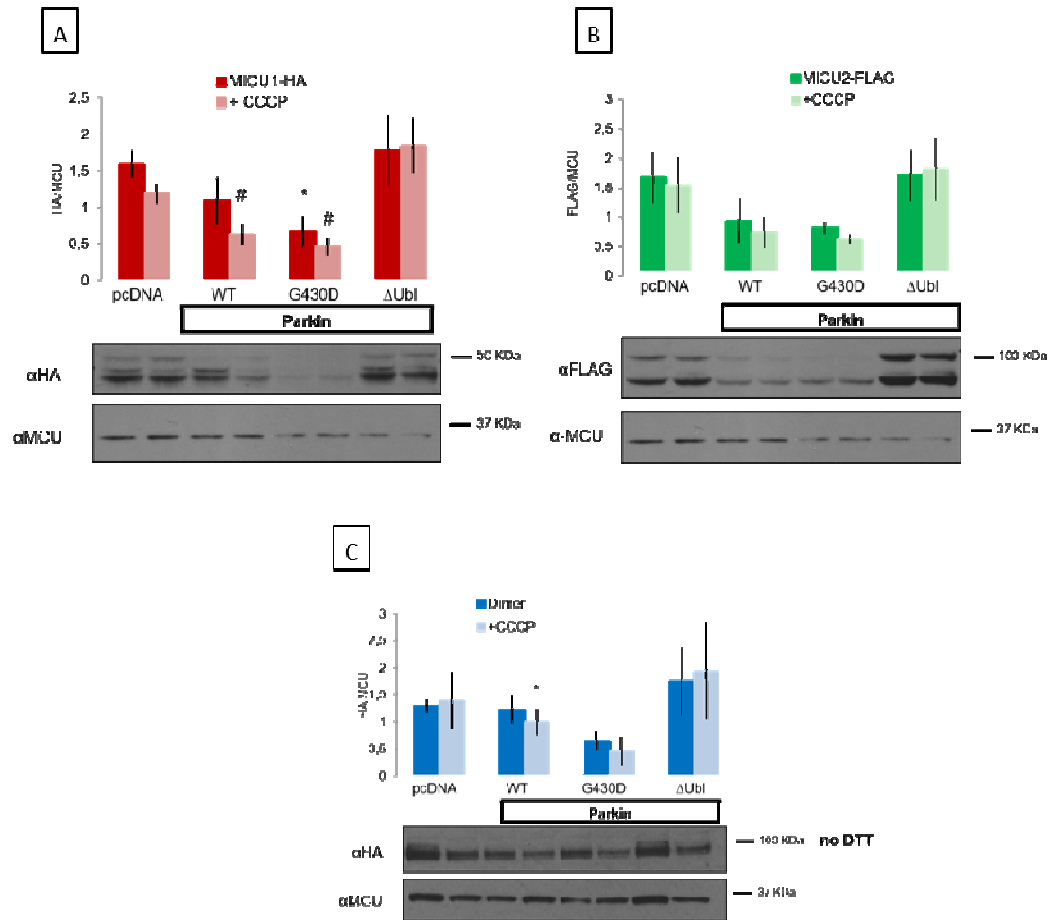


Fig. 4.9 Regolazione Parkin-dipendente dei livelli del dimero e di MICU1 e MICU2 quando co-espressi

Cellule HeLa sono state transfettate con MICU1-HA+MICU2-Flag e diversi costrutti di Parkin come indicato. Dopo 24h le cellule vengono trattate con CCCP 10 μ M per 2h e poi lisate in presenza o assenza di DTT. Il lisato proteico è stato sottoposto a Western blot e analizzato con anticorpo anti-HA o anti-Flag, MCU è stato utilizzato come normalizzatore.

A-B Analisi densitometrica dei livelli proteici di MICU1 e MICU2, quando co-espressi, normalizzati su MCU. Ogni barra rappresenta la media \pm S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. (Student's t-test * $p < 0.05$ versus pcDNA; # $p < 0.05$ versus pcDNA+CCCP). L'immagine rappresentativa di Western blot, mostra l'effetto dei diversi costrutti di Parkin sui livelli proteici dei monomeri MICU1 e MICU2, quando co-espressi, in presenza o meno di CCCP.

C Analisi densitometrica dei livelli proteici del dimero normalizzati su MCU. Ogni barra rappresenta la media \pm S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti (Student's t-test * $p < 0.05$ versus pcDNA). L'immagine rappresentativa di Western blot, in assenza di DTT, mostra l'effetto dei diversi costrutti di Parkin sui livelli proteici del dimero in presenza o meno di CCCP.

4.5 Interazione MICU1-Parkin

Per verificare l'interazione tra MICU1 e Parkin sono stati effettuati esperimenti di co-immunoprecipitazione: attraverso l'utilizzo di un anticorpo specifico per Parkin coniugato a biglie di agarosio, è stato possibile precipitare dal lisato totale Parkin o il suo mutante Δ Ubl, con le sue proteine associate.

Analizzando il lisato totale i livelli proteici di MICU1-HA venivano notevolmente ridotti dall'overespressione di Parkin, come già osservato negli esperimenti di co-espressione, e si poteva notare che il trattamento con l'inibitore del proteasoma, MG132, induceva una reversione di questo effetto, confermando il coinvolgimento dell'UPS.

Nell'analisi delle proteine immunoprecipitate con Parkin, l'anticorpo per il tag (α HA) era in grado di identificare una banda intorno ai 50 kDa soltanto nelle cellule co-transfettate con MICU1-HA con una maggiore intensità nel gruppo Parkin-wt trattato con MG132. Questo conferma l'associazione di MICU1 con Parkin che si riduce notevolmente nel mutante privo della regione Ubl. (Fig. 4.10).

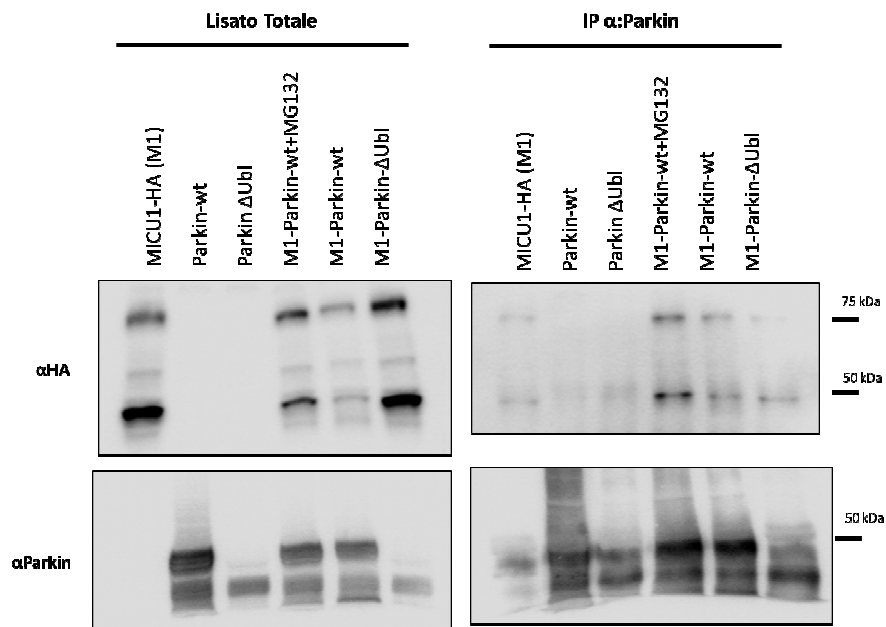


Fig. 4.10 Interazione fisica tra MICU-1 e Parkin

Cellule HeLa sono state transfettate con i costrutti indicati. Per aumentare i livelli di MICU1-HA in presenza di Parkin è stato effettuato un trattamento con MG132 10 μ M per tutta la notte. Parkin, o il mutante Δ Ubl, è stato immunoprecipitato dal lisato totale tramite un anticorpo anti-Parkin. Le proteine co-immunoprecipitate sono state analizzate con un anticorpo anti HA per osservare l'associazione con MICU1.

4.6 Regolazione da parte di Parkin della risposta mitocondriale al calcio

Dato il ruolo fondamentale del complesso dell'uniporto nella regolazione del calcio e nella capacità tamponante del mitocondrio, con possibili implicazioni sulla sopravvivenza cellulare, abbiamo successivamente voluto analizzare se l'overespressione di Parkin fosse in grado di modificare la risposta mitocondriale ad un aumento citosolico di calcio. L'analisi sfrutta l'utilizzo di una sonda proteica detta Aequorina, che reagisce irreversibilmente al legame del calcio emettendo fotoni, rilevabili attraverso uno spettrofotometro.

La risposta mitocondriale viene evocata tramite la stimolazione con Istamina (100 μ M), in cellule HeLa in cui MICU1-HA, MICU2-Flag o MCU-Flag vengono simultaneamente overesprese con Parkin-wt o il mutante Δ Ubl.

E' già noto che l'overespressione dei diversi componenti del complesso MCU induce effetti sulla risposta mitocondriale al calcio. MICU1 produce un marcato aumento dell'ingresso di calcio, a seguito della stimolazione citosolica: ciò è in accordo con la sua natura di attivatore di MCU. MICU2 produce l'effetto opposto come concerne ad un inibitore. Nel caso dell'overespressione di MCU si osserva comunque un'aumentata risposta mitocondriale dovuta probabilmente allo squilibrio tra i livelli del canale e dei suoi regolatori (De Stefani, Raffaello et al. 2011; Patron, Checchetto et al. 2014).

Nella Fig. 4.11 vengono mostrate sia le tracce relative alla risposta mitocondriale a seguito di stimolazione con Istamina, sia gli istogrammi relativi alla concentrazione di calcio mitocondriale raggiunta al picco della risposta.

E' possibile osservare che la presenza di Parkin-wt è in grado di modificare l'effetto indotto dall'overespressione di MICU1 ma non quello indotto dagli altri componenti del complesso (MICU2 e MCU). L'aumento della risposta mitocondriale dovuta all'overespressione di MICU1 viene significativamente ridotta dalla forma wt di Parkin ma non dal mutante Δ Ubl.

Nel caso di MICU2 e MCU le risposte non sono modificate da nessun costrutto di Parkin.

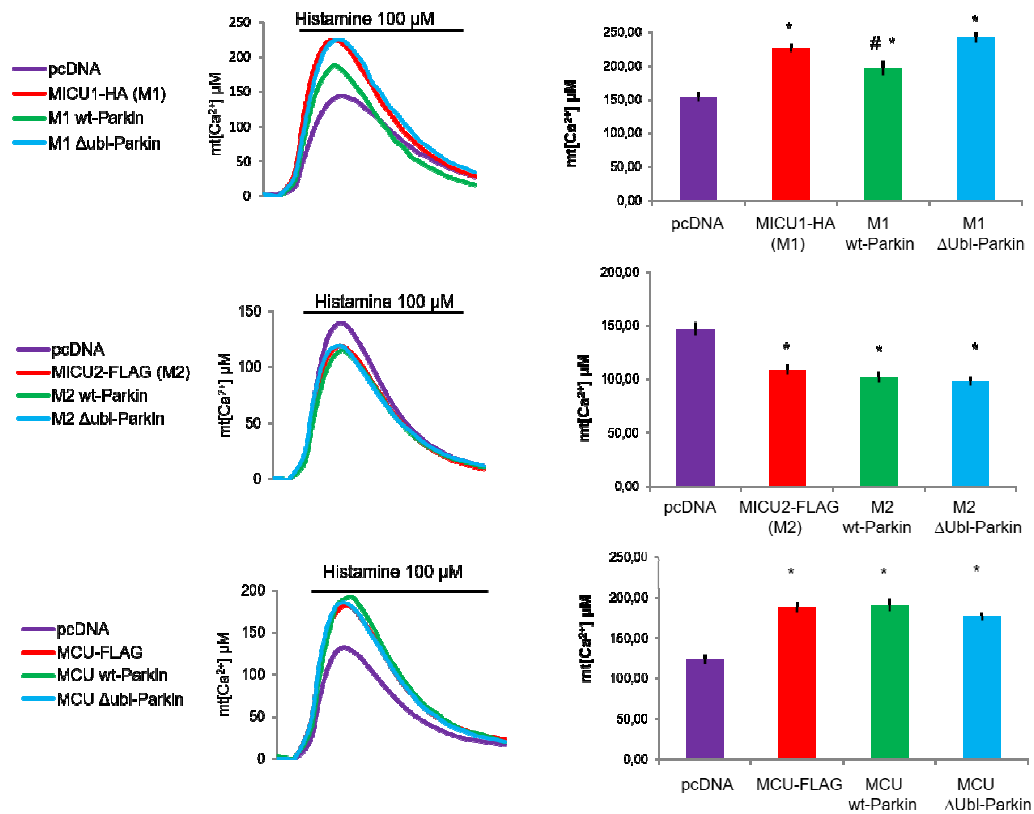


Fig. 4.10 Regolazione Parkin-dipendente della risposta mitocondriale al calcio

Analisi della risposta mitocondriale a un aumento di citosolico di calcio in cellule HeLa co-transfettate con MICU1-HA, MICU2-Flag, MCU-Flag ed i costrutti di Parkin indicati. A sinistra tracce rappresentative a seguito di stimolazione con Istamina 100 μM . A destra analisi della concentrazione mitocondriale al picco massimo della risposta. Ogni barra rappresenta la media \pm S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti (Student's t-test * $p < 0.05$ versus pcDNA; # $p < 0.05$ versus MICU1-HA).

4.7 Effetto di Pink1 sui livelli proteici di MICU1

Infine, considerando il ruolo fondamentale del dominio Ubl per l'attività di Parkin su MICU1, abbiamo investigato uno dei possibili meccanismi regolatori. Diverse evidenze sperimentali hanno mostrato che la regione Ubl, ad elevata omologia con l'ubiquitina, può essere fosforilata dalla chinasi mitocondriale Pink1. Pink1 e Parkin, entrambi coinvolti in forme familiari di Parkinson, collaborano nel controllo di qualità delle proteine mitocondriali (Narendra and Youle 2011).

Abbiamo quindi valutato l'effetto dell'overespressione di Pink1 sui livelli proteici di MICU1-HA. L'analisi degli esperimenti di Western blot ha evidenziato una notevole riduzione di MICU1 rispetto al basale, della stessa entità indotta da Parkin-wt.

Dalle immagini è possibile notare una peculiare differenza tra le due condizioni: mentre nel caso di Parkin era la banda più alta ad essere maggiormente coinvolta, l'overespressione di Pink, in tutti i Western blot analizzati, induceva la scomparsa della banda più bassa. La co-espressione di Pink1 e Parkin-wt non produceva un effetto additivo sull'espressione di MICU1-HA, mentre la presenza di Pink1 determinava una riduzione dei livelli proteici in presenza del mutante Parkin- Δ Ubl (Fig 4.11).

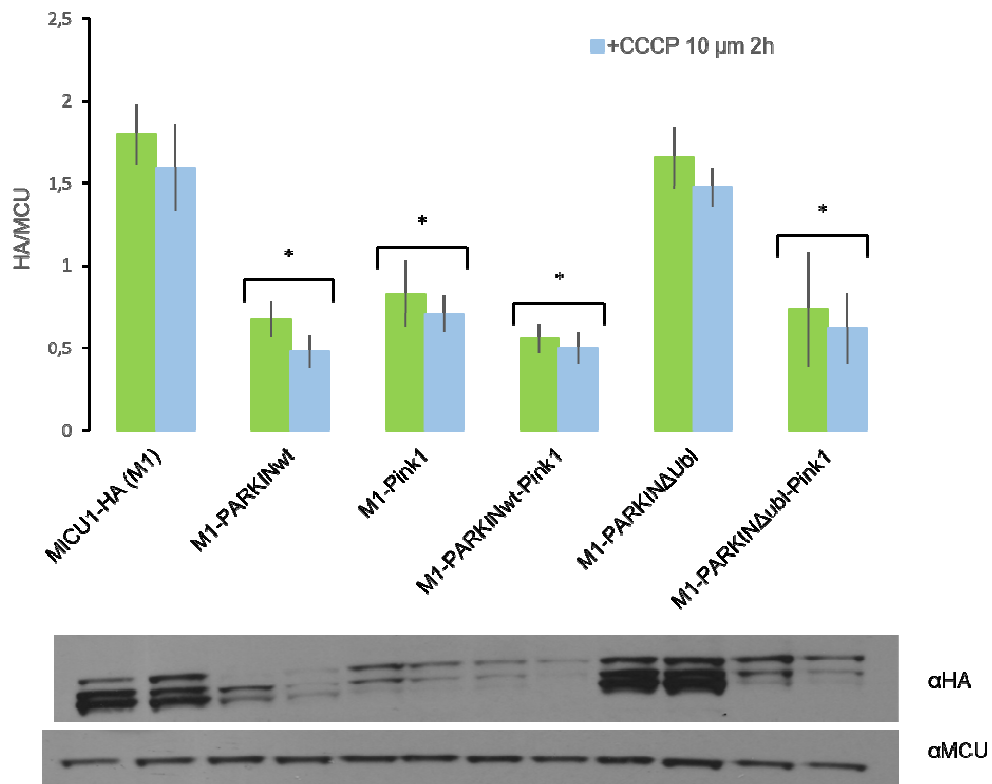


Fig. 4.11 Regolazione da parte di Pink1 dei livelli proteici di MICU1

Cellule HeLa sono state transfettate con MICU1-HA e Parkin-wt o Pink1, come indicato. Dopo 24h le cellule vengono trattate con CCCP 10 μ M per 2h e poi lisate. Il lisato proteico è stato sottoposto a Western blot e analizzato con anticorpo anti-HA. MCU è stato utilizzato come normalizzatore.

In alto analisi densitometrica dei livelli proteici normalizzati su MCU. Ogni barra rappresenta la media \pm S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. (Student's t-test * $p < 0.05$ versus MICU1-HA). In basso immagine rappresentativa di Western blot.

5. Discussione e conclusioni

Le proteine mitocondriali dopo aver terminato la loro attività o in risposta ad un danno devono essere efficientemente rimosse. Affinché questo sia compiuto efficientemente, i mitocondri posseggono diversi meccanismi di controllo di qualità proteico.

Solitamente quando quest'organello è seriamente danneggiato o mal funzionante viene rimosso attraverso la mitofagia, processo selettivo di eliminazione mediante un autofagosoma (Hamacher-Brady and Brady 2015). In questo caso l'intero contenuto dei mitocondri, incluse le sue proteine, è soggetto alla degradazione lisosomiale.

Il controllo qualità sulle singole proteine viene invece assicurato da proteasi ATP dipendenti che operano nei diversi compartimenti dell'organello rimuovendo proteine non assemblate e malripiegate (Varabyova, Stojanovski et al. 2013).

La degradazione proteica nel citosol, invece, è principalmente assicurata dal sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). L'UPS gioca un ruolo importante in una serie di processi cellulari fondamentali. L'elemento centrale di questo sistema è rappresentato dal legame covalente dell'ubiquitina ai substrati proteici, riconosciuti in questo modo dal proteasoma (Hershko and Ciechanover 1998).

Ad oggi non è chiaro se proteine presenti all'interno dei mitocondri possano essere degradate tramite l'UPS. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo dell'ubiquitinazione nel controllo di qualità mitocondriale (Radke, Chander et al. 2008). Diverse proteine critiche per le funzioni mitocondriali come le subunità I, III e IV della citocromo ossidasi si accumulano a seguito di trattamento con inibitori del proteasoma (Margineantu, Emerson et al. 2007). Inoltre il 26S proteasoma sembra essere implicato nel turnover di alcune proteine intramitocondriali (UCP1-2-3) (Azzu, Mookerjee et al. 2010; Azzu, Jastroch et al. 2010; Clarke, Adams et al. 2012).

Il complesso dell'uniporto mitocondriale del calcio è una struttura multiproteica presente nella membrana mitocondriale interna, composta dal canale (MCU) e da diverse proteine accessorie incluse MICU1 e MICU2 (De Stefani, Patron et al. 2015).

L'azione combinata dei vari regolatori è richiesta per il controllo della concentrazione di calcio nella matrice, cruciale per sostenere la bioenergetica cellulare e regolare la risposta apoptotica (Mammucari, Raffaello et al. 2016).

Per soddisfare questo compito ed evitare condizioni patologiche, associate a deregolazione delle vie di segnalazione mediate dal calcio, il turnover intracellulare delle varie componenti del complesso MCU deve essere finemente controllato e può rappresentare un'ulteriore fase modulatoria. I meccanismi e le parti in gioco coinvolte nei processi di sintesi e di degradazione di queste proteine non sono ancora noti. Un recente lavoro descrive la biogenesi di MICU1 mostrando che è Mia40, un'ossidoreduttasi dello spazio intermembrana, a mediare la dimerizzazione di MICU1 con MICU2, attraverso la formazione di ponti disolfuro. L'eterodimero risultante interagisce con MCU in maniera calcio dipendente e controlla l'ingresso mitocondriale di calcio (Petrungaro, Zimmermann et al. 2015).

Alla luce di quanto emerso, la mia attività di ricerca, descritta nella presente tesi sperimentale, ha cercato di fornire maggiori informazioni sulla regolazione post-traduzionale dei regolatori di MCU, in particolare in termini di stabilità.

L'utilizzo delle cellule HeLa come modello sperimentale mi ha permesso di overesprimere facilmente geni esogeni e di visualizzare i meccanismi molecolari coinvolti. L'analisi del turnover di una proteina è il primo step per stabilire se la sua funzione viene regolata attraverso la proteolisi in specifiche condizioni fisiologiche (Zhou 2004). L'emivita delle componenti del complesso MCU è stata valutata attraverso l'analisi dei livelli proteici nel tempo dopo il blocco della sintesi proteica con cicloesimmide.

Dai risultati è stata evidenziata un'elevata stabilità del canale MCU, responsabile dell'ingresso del calcio nei mitocondri. A questa stabilità può contribuire la sua natura transmembranaria poiché proteine appartenenti a questa classe sono caratterizzate da un'emivita più lunga. I motivi di questa caratteristica derivano da una maggiore difficoltà di degradazione, che deve prevedere l'estrazione dalla membrana, e dal vantaggio che la cellula trae nel regolarne l'attività attraverso interattori piuttosto che tramite il turnover.

Osservando il comportamento dei regolatori si evidenzia che MICU1 è caratterizzato da un'emivita più breve di MICU2. Dopo 4h di blocco della sintesi proteica il livello di MICU1 raggiunge valori inferiori al 10% rispetto alla condizione basale (t0) mentre nello stesso arco di tempo i livelli di MICU2 si mantengono stabili.

La co-espressione dei due regolatori favorisce la formazione dell'eterodimero MICU1-MICU2: è noto che questa interazione avviene nello spazio intermembrana, attraverso la formazione di ponti disolfuro (Patron, Checchetto et al. 2014; Petrunger, Zimmermann et al. 2015).

In questa condizione, dalle immagini di Western blot dei singoli monomeri, si osserva un aumento relativo della banda più bassa rispetto a quella più alta sia per MICU1 che per MICU2, suggerendo un aumento dell'ingresso nei mitocondri. Le diverse bande identificate dagli anticorpi corrispondono infatti ai diversi stadi di processamento delle proteine mitocondriali, la banda a più alto peso molecolare rappresenta la forma proteica contenente la sequenza di localizzazione, che verrà eliminata dalle peptidasi mitocondriali dopo l'importo (Mossmann, Meisinger et al. 2012).

La valutazione dell'emivita delle forme monomeriche, quando entrambi i regolatori sono overespressi, evidenzia una protezione dalla degradazione che potrebbe essere spiegata con la maggiore localizzazione mitocondriale di MICU1 e MICU2 e la stabilizzazione di queste proteine nella forma eterodimerica. Anche il decadimento dei livelli proteici del dimero, sebbene significativo a 3 e 4 ore di trattamento con CHX, è ridotto rispetto ai livelli osservati per MICU1.

Come detto in precedenza il coinvolgimento del sistema citosolico ubiquitina-proteasoma nella degradazione di proteine mitocondriali non è chiaro. Alcuni lavori ne sostengono un ruolo nella regolazione di proteine presenti nello spazio intermembrana (Clarke, Adams et al. 2012; Bragoszewski, Gornicka et al. 2013). Allo scopo di valutarne il ruolo nella degradazione di MICU1, MICU2 e del dimero è stato utilizzato l'inibitore del proteasoma MG132.

I risultati mostrano che la diminuzione dei livelli proteici di MICU1, osservata a 2, 3 e 4 ore di trattamento con cicloesimmide, viene significativamente ridotta dal simultaneo trattamento con l'MG132. A differenza della forma monomerica, per quanto riguarda il dimero MICU1-MICU2, nonostante si osservi una parziale proteolisi a 3 e 4 ore di blocco della sintesi proteica, l'inibizione del proteasoma non è in grado di prolungarne l'emivita.

I dati evidenziano quindi come il turnover di MICU1 sia parzialmente controllato dall'UPS, ma ciò non avviene quando questo regolatore è integrato nell'eterodimero,

lasciando supporre una protezione dalla degradazione proteasomica a seguito della localizzazione mitocondriale.

L'ubiquitinazione rappresenta il principale segnale di indirizzamento di un substrato al proteasoma. A conferma di ciò negli esperimenti di immunoprecipitazione si osserva un aumento delle proteine ubiquitinate a seguito di trattamento con MG132. Tra queste, attraverso l'utilizzo dell'anticorpo specifico è stata rilevata la presenza di MICU1 che conferma l'ipotesi di una regolazione tramite UPS.

Il legame dell'ubiquitina avviene a carico di una lisina presente nella sequenza amminoacidica della proteina target attraverso l'azione consecutiva di tre enzimi: E1 attiva l'ubiquitina, E2 è un enzima di coniugazione, E3 lega l'ubiquitina al substrato (Hershko and Ciechanover 1998).

L'analisi di alcuni mutanti di MICU1, privi di lisine in determinate posizioni, non ha condotto all'identificazione del sito responsabile dell'indirizzamento alla degradazione proteasomica. Considerato che la sequenza di MICU1 contiene più di 40 lisine, la ricerca risulta complessa e necessita di ulteriori esperimenti. Non è da escludere il coinvolgimento di siti multipli di ubiquitinazione (Komander 2009).

L'interesse si è quindi spostato sulla ricerca dell'enzima (E3) coinvolto nel legame dell'ubiquitina a MICU1.

Parkin (PARK2), una E3 ligasi le cui mutazioni rappresentano la causa più comune di forme familiari di Parkinson (AR-JP) (Lucking, Durr et al. 2000), è coinvolta nell'ubiquitinazione di più di trenta substrati presenti sulla membrana mitocondriale esterna (VDAC, mitofusine, TOM) durante i processi di eliminazione mitocondriale (mitofagia) in risposta alla depolarizzazione (Sarraf, Raman et al. 2013). È generalmente accettato il suo ruolo nella regolazione del controllo di qualità e della degradazione selettiva mediata dal proteasoma. Numerosi substrati di Parkin sono stati identificati prima che fosse chiaro il suo legame ai mitocondri e un lavoro recente evidenzia il coinvolgimento di Parkin nella degradazione proteasomica di un repressore trascrizionale (PARIS) implicato nella biogenesi mitocondriale (Shin, Ko et al. 2011). Ciò suggerisce la possibilità di un potenziale ruolo di Parkin in funzioni indipendenti dalla mitofagia, come la modulazione dell'attività del proteasoma e la degradazione selettiva di specifiche proteine mitocondriali (Scarffe, Stevens et al. 2014).

Per i suddetti motivi la mia ricerca è proseguita con l'intento di valutare se Parkin fosse coinvolto nella regolazione dei livelli proteici delle componenti del complesso MCU e se fosse quindi responsabile dell'ubiquitinazione di MICU1.

L'overespressione del costrutto wt di Parkin in cellule HeLa determina un effetto notevole sui regolatori del complesso ma non sul canale. Si osserva una significativa riduzione dei livelli di espressione proteica di MICU1 e di MICU2 quando singolarmente overespressi, mentre nel caso di co-espressione l'effetto è notevolmente ridotto sia osservando la forma monomerica che dimerica dei regolatori.

Da un'ulteriore analisi del pattern di bande rilevate tramite Western blot si nota una diminuzione prevalente della banda a più alto peso molecolare sia per MICU1 che per MICU2. Dati sperimentali presenti in letteratura evidenziano una stretta relazione tra i livelli di queste due proteine; il silenziamento genico di MICU1 è infatti associato alla scomparsa proteica di MICU2 (Patron, Checchetto et al. 2014). Questo suggerisce che l'attività di Parkin potrebbe essere coinvolta nella regolazione dei livelli citosolici di MICU1, prima dell'importo mitocondriale, ed influenzare a sua volta la presenza di MICU2.

A sostegno di questa ipotesi è anche l'analisi delle stesse condizioni sperimentali osservate dopo trattamento per 2 ore con CCCP. Questo composto chimico è in grado di favorire la migrazione di Parkin ai mitocondri inducendo la depolarizzazione mitocondriale e l'attivazione di fenomeni Parkin-dipendenti. Nel nostro caso la localizzazione mitocondriale di Parkin non sembra modificare l'entità della riduzione dei livelli proteici di MICU1 e MICU2. Ciò suggerisce che, anche dopo trattamento con CCCP, non si osserva una stimolazione dell'attività ligasica nei confronti dei due regolatori e che i livelli citosolici di Parkin sono comunque sufficienti a mediare gli effetti osservati.

Parkin è una proteina caratterizzata da una struttura complessa e dinamica, in cui ogni dominio svolge una funzione specifica ed importante per la regolazione dell'attività enzimatica, come dimostrato dalla presenza di mutazioni patogenetiche su tutta la sua sequenza (Cruts, Theuns et al. 2012).

La mutazione puntiforme G430D cade nel sito attivo RING2, nei pressi della cisteina catalitica, e potrebbe interferire con l'attività enzimatica, sebbene in letteratura i dati siano contrastanti. E' invece ben caratterizzato il ruolo della regione Ubl, coinvolta nei

meccanismi auto-inibitori e nell'attivazione di Parkin mediata da Pink1 (Sauve, Lilov et al. 2015), diverse mutazioni sono state rilevate in questo dominio nelle forme familiari di Parkinson. La valutazione dell'attività del mutante G430D e di una forma tronca di Parkin, priva della regione Ubl (Δ Ubl), sui livelli proteici di MICU1 e MICU2 ha prodotto effetti molto diversi. Mentre la presenza della mutazione G430D induce una riduzione dei due regolatori paragonabile a quella del wt, il Parkin- Δ Ubl non è in grado di modificare livelli basali sia delle forme monomeriche di MICU1 e MICU2 che del dimero. Questo sottolinea l'importanza di questa regione negli eventi, mediati da Parkin, che portano alla degradazione dei regolatori di MCU. Sebbene l'autoregolazione che avviene tramite questo dominio porti a pensare che la sua assenza conduca ad un enzima costitutivamente attivo, i dati ottenuti da questi esperimenti rivelano un ruolo alternativo di questa regione. Diversi gruppi di ricerca hanno già evidenziato funzioni alternative dell'Ubl, tra cui l'associazione ai substrati e il legame al proteasoma (Finney, Walther et al. 2003; Sakata, Yamaguchi et al. 2003). Ho quindi valutato l'interazione tra MICU1 e Parkin attraverso esperimenti di immunoprecipitazione. Questi hanno dimostrato che avviene un'interazione fisica tra le due proteine, notevolmente ridotta in presenza del costrutto mutato privo del dominio Ubl. Ciò potrebbe rappresentare la causa della mancata degradazione di MICU1.

I principali sintomi del morbo di Parkinson derivano dalla morte dei neuroni dopaminergici nella sostanza nigra. In questi neuroni il calcio, che entra dalla membrana plasmatica, sostiene la fosforilazione ossidativa nei mitocondri e previene carenze energetiche a seguito della richiesta cellulare di ATP. Il calcio rappresenta il principale secondo messaggero implicato nella trasduzione dei segnali cellulari. Le concentrazioni citosoliche devono essere efficientemente regolate in modo tale da codificare informazioni limitate nello spazio e nel tempo. Come descritto in precedenza i mitocondri presentano un ruolo centrale nella modulazione del calcio, captando e rilasciando questo ione attraverso raffinati meccanismi (Elustondo, Nichols et al. 2016). Il fallimento dei meccanismi di regolazione induce condizioni di stress ossidativo, alterazioni proteostatiche, mitofagia ed apoptosi, tutti fenomeni coinvolti nella neurodegenerazione (Surmeier, Schumacker et al. 2016).

La regolazione dei livelli proteici di MICU1 da parte di Parkin, osservata dai risultati finora discussi, potrebbe influenzare la risposta mitocondriale ad un aumento citosolico di calcio ed avere risvolti sulla fisiologia mitocondriale. Gli effetti sul calcio mitocondriale mediati dall'overespressione di MICU1, MICU2, e MCU (Fig.4.10) sono già noti e rispecchiano la funzione dei singoli componenti (De Stefani, Raffaello et al. 2011; Patron, Checchetto et al. 2014).

Analizzando i risultati in condizioni di overespressione di Parkin si osserva anche in questo caso una modulazione specifica di MICU1. Il costrutto wt, ma non quello privo del dominio Ubl, riduce la stimolazione dell'ingresso di calcio tramite MCU indotta da MICU1. Ciò evidenzia come la modulazione del turnover abbia conseguenze sulla funzione della proteina.

I dati in letteratura supportano il ruolo fondamentale del dominio Ubl nell'attivazione di Parkin mediata dalla chinasi mitocondriale Pink1, che quindi si dimostra essere un possibile candidato nella ricerca di un meccanismo regolatorio (Narendra and Youle 2011). Nelle cellule di mammifero, la cooperazione tra Parkin e Pink1 assicura l'eliminazione selettiva dei mitocondri non funzionanti, mediando la protezione cellulare (Pickrell and Youle 2015).

Inaspettatamente l'overespressione di Pink1 in cellule HeLa risulta in una significativa riduzione dei livelli proteici di MICU1: ciò potrebbe derivare da un aumento dell'attivazione di Parkin endogeno. Analizzando le immagini di Western blot però si osserva un comportamento differente dall'overespressione di Parkin. Mentre quest'ultimo riduce in primo luogo la banda più alta di MICU1, corrispondente alla forma citosolica, Pink1 influenza i livelli della banda più bassa, facendo ipotizzare un'alterazione nella localizzazione mitocondriale di MICU1. L'effetto potrebbe derivare anche da alterazioni della morfologia dei mitocondri legati all'induzione di mitofagia indotta dall'overespressione di Pink1. La co-espressione di Pink1 e Parkin-wt non evidenzia alcun effetto additivo sui livelli di MICU1 mentre l'azione di Pink1 prevale sul mutante Parkin- Δ Ubl, inducendo una riduzione dei livelli del regolatore. I dati ottenuti da quest'ultima analisi fanno ipotizzare vie differenti nella modulazione da parte di Parkin e Pink1 nella modulazione di MICU1.

In conclusione il presente studio mette alla luce come MICU1, il regolatore positivo dell'unipoter mitocondriale del calcio, selettivamente rispetto alle altre componenti

del complesso, è caratterizzato da un turnover rapido che coinvolge parzialmente il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Questo meccanismo di regolazione non deriva da processi di retrotraslocazione ma sembra avvenire nel citosol, prima dell'ingresso di MICU1 nei mitocondri. Il coinvolgimento dell'UPS nella degradazione di proteine intra-mitocondriali è ancora dibattuto, sebbene l'esistenza di meccanismi di controllo di qualità pre-importo sia stata osservata per altre proteine mitocondriali (Clarke, Adams et al. 2012; Bertolin, Jacoupy et al. 2015).

Inoltre è stata identificata l'E3 ligasi Parkin, coinvolta nella patogenesi del morbo di Parkinson, come potenziale candidato coinvolto nella regolazione di MICU1 poiché la sua overespressione ne riduce i livelli basali.

Parkin interagisce fisicamente con MICU1 e la presenza del dominio Ubl sembra essere fondamentale sia per l'interazione che per la degradazione di questo regolatore di MCU.

I dati sostengono un modello in cui Parkin partecipa alla regolazione selettiva di MICU1 contribuendo alla modulazione dei segnali mitocondriali di calcio ed evidenziando che alterazioni nella capacità dei mitocondri di captare calcio possono contribuire all'insorgenza del Parkinson.

Il ruolo di Parkin nella cellula non è sicuramente ristretto al turnover mediante mitofagia, come sostenuto dalla maggior parte dei lavori pubblicati prima del 2008 che descrivono il suo coinvolgimento nel controllo di qualità proteico. Non è chiaro se l'ubiquitinazione Parkin-dipendente in eventi non mitofagici sia promossa dai medesimi meccanismi di attivazione (Bertolin, Jacoupy et al. 2015).

Il calcio mitocondriale ha sicuramente una funzione fondamentale nella vita e nella morte cellulare e le proteine deputate al controllo del suo ingresso e della sua uscita dall'organello sono oggetto di intenso studio. Nonostante sia ormai noto il ruolo importante di MICU1 in condizioni fisiologiche, negli ultimi anni sta emergendo il suo coinvolgimento in condizioni patologiche (Logan, Szabadkai et al. 2014; Antony, Paillard et al. 2016).

Quindi, tenendo in considerazione le alterazioni proteolitiche e mitocondriali osservate nel Parkinson, la regolazione messa in luce da questo lavoro di tesi potrebbe rappresentare un importante target farmacologico.

6. Bibliografia

- Abbas, N., C. B. Lucking, et al. (1999). "A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease." Hum Mol Genet **8**(4): 567-74.
- Abeliovich, A. (2014). "Neurological disorders: Quality-control pathway unlocked." Nature **510**(7503): 44-5.
- Antony, A. N., M. Paillard, et al. (2016). "MICU1 regulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake dictates survival and tissue regeneration." Nature Communications **7**.
- Ashrafi, G. and T. L. Schwarz (2013). "The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria." Cell Death Differ **20**(1): 31-42.
- Augustin, S., M. Nolden, et al. (2005). "Characterization of peptides released from mitochondria: evidence for constant proteolysis and peptide efflux." J Biol Chem **280**(4): 2691-9.
- Azzu, V., M. Jastroch, et al. (2010). "The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 785-91.
- Azzu, V., S. A. Mookerjee, et al. (2010). "Rapid turnover of mitochondrial uncoupling protein 3." Biochem J **426**(1): 13-7.
- Baker, B. M. and C. M. Haynes (2011). "Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging." Trends Biochem Sci **36**(5): 254-61.
- Baughman, J. M., F. Perocchi, et al. (2011). "Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter." Nature **476**(7360): 341-5.
- Bernales, S., K. L. McDonald, et al. (2006). "Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response." PLoS Biol **4**(12): e423.
- Bernardi, P. (1984). "Modulation of Ca²⁺ efflux and rebounding Ca²⁺ transport in rat liver mitochondria." Biochim Biophys Acta **766**(2): 277-82.
- Berridge, M. J. (2009). "Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms." Biochim Biophys Acta **1793**(6): 933-40.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Bertolin, G., M. Jacoupy, et al. (2015). "Parkin maintains mitochondrial levels of the protective Parkinson's disease-related enzyme 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 10." Cell Death Differ **22**(10): 1563-76.

Betarbet, R., T. B. Sherer, et al. (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." Nat Neurosci **3**(12): 1301-6.

Bhattacharyya, S., H. Yu, et al. (2014). "Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(2): 122-33.

Bohley, P. (1995). "The fates of proteins in cells." Naturwissenschaften **82**(12): 544-550.

Borland, M. K., K. P. Mohanakumar, et al. (2009). "Relationships among molecular genetic and respiratory properties of Parkinson's disease cybrid cells show similarities to Parkinson's brain tissues." Biochim Biophys Acta **1792**(1): 68-74.

Braak, H., E. Ghebremedhin, et al. (2004). "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." Cell Tissue Res **318**(1): 121-34.

Bragoszewski, P., A. Gornicka, et al. (2013). "The ubiquitin-proteasome system regulates mitochondrial intermembrane space proteins." Mol Cell Biol **33**(11): 2136-48.

Brini, M. (2008). "Calcium-sensitive photoproteins." Methods **46**(3): 160-6.

Brown, M. S., J. Ye, et al. (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." Cell **100**(4): 391-8.

Cali, T., D. Ottolini, et al. (2012). "Mitochondrial Ca(2+) and neurodegeneration." Cell Calcium **52**(1): 73-85.

Campello, S., F. Strappazon, et al. (2014). "Mitochondrial dismissal in mammals, from protein degradation to mitophagy." Biochim Biophys Acta **1837**(4): 451-60.

Cardenas, C., R. A. Miller, et al. (2010). "Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca2+ transfer to mitochondria." Cell **142**(2): 270-83.

Celardo, I., L. M. Martins, et al. (2013). "Unravelling mitochondrial pathways to Parkinson's disease." Br J Pharmacol **171**(8): 1943-57.

Chan, D. C. (2006). "Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development." Cell **125**(7): 1241-52.

Chatenay-Lapointe, M. and G. S. Shadel (2010). "Stressed-out mitochondria get MAD." Cell Metab **12**(6): 559-60.

Chaugule, V. K., L. Burchell, et al. (2011). "Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain." EMBO J **30**(14): 2853-67.

Chen, Y. and G. W. Dorn, 2nd (2013). "PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria." Science **340**(6131): 471-5.

Chu, C. T., H. Bayir, et al. (2013). "LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease." Autophagy **10**(2): 376-8.

Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." Cell **131**(6): 1047-58.

- Clarke, K. J., A. E. Adams, et al. (2012). "A role for ubiquitylation and the cytosolic proteasome in turnover of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1)." Biochim Biophys Acta **1817**(10): 1759-67.
- Cohen-Kaplan, V., I. Livneh, et al. (2016). "The ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities." Int J Biochem Cell Biol.
- Cook, C., C. Stetler, et al. (2012). "Disruption of protein quality control in Parkinson's disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(5): a009423.
- Crosas, B., J. Hanna, et al. (2006). "Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities." Cell **127**(7): 1401-13.
- Cruts, M., J. Theuns, et al. (2012). "Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases." Hum Mutat **33**(9): 1340-4.
- Csordas, G., A. P. Thomas, et al. (1999). "Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria." EMBO J **18**(1): 96-108.
- Cuervo, A. M., E. Bergamini, et al. (2005). "Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells." Autophagy **1**(3): 131-40.
- Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.
- De Stefani, D., M. Patron, et al. (2015). "Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex." Biochim Biophys Acta **1853**(9): 2006-11.
- De Stefani, D., A. Raffaello, et al. (2011). "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter." Nature **476**(7360): 336-40.
- Dorsey, E. R., R. Constantinescu, et al. (2007). "Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030." Neurology **68**(5): 384-6.
- Dove, K. K. and R. E. Klevit (2013). "Structural Biology: Parkin's Serpentine Shape Revealed in the Year of the Snake." Curr Biol **23**(16): R691-3.
- Duchen, M. R. (2000). "Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death." J Physiol **529 Pt 1**: 57-68.
- Dupont, G. and L. Combettes (2016). "Fine tuning of cytosolic Ca (2+) oscillations." F1000Res **5**.
- Ekholm-Reed, S., M. S. Goldberg, et al. (2013). "Parkin-dependent degradation of the F-box protein Fbw7beta promotes neuronal survival in response to oxidative stress by stabilizing Mcl-1." Mol Cell Biol **33**(18): 3627-43.
- Elustondo, P. A., M. Nichols, et al. (2016). "Mitochondrial Ca²⁺ uptake pathways." J Bioenerg Biomembr.
- Emmanouilidou, E., L. Stefanis, et al. (2010). "Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome." Neurobiol Aging **31**(6): 953-68.

- Finley, D. (2009). "Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome." Annu Rev Biochem **78**: 477-513.
- Finley, D., H. D. Ulrich, et al. (2012). "The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **192**(2): 319-60.
- Finney, N., F. Walther, et al. (2003). "The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain." J Biol Chem **278**(18): 16054-8.
- Forno, L. S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." J Neuropathol Exp Neurol **55**(3): 259-72.
- Gasser, T. (2001). "Genetics of Parkinson's disease." J Neurol **248**(10): 833-40.
- Gegg, M. E., J. M. Cooper, et al. (2010). "Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy." Hum Mol Genet **19**(24): 4861-70.
- Giasson, B. I. and V. M. Lee (2000). "A new link between pesticides and Parkinson's disease." Nat Neurosci **3**(12): 1227-8.
- Giorgi, C., A. Romagnoli, et al. (2008). "Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death." Curr Mol Med **8**(2): 119-30.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Gobbi, P., P. Castaldo, et al. (2007). "Mitochondrial localization of Na⁺/Ca²⁺ exchangers NCX1-3 in neurons and astrocytes of adult rat brain in situ." Pharmacol Res **56**(6): 556-65.
- Grice, G. L. and J. A. Nathan (2016). "The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome." Cell Mol Life Sci **73**(18): 3497-506.
- Guardia-Laguarta, C., E. Area-Gomez, et al. (2014). "alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes." J Neurosci **34**(1): 249-59.
- Hamacher-Brady, A. and N. R. Brady (2015). "Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy." Cell Mol Life Sci **73**(4): 775-95.
- Hamacher-Brady, A. and N. R. Brady (2016). "Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy." Cell Mol Life Sci **73**(4): 775-95.
- Hammerling, B. C. and A. B. Gustafsson (2014). "Mitochondrial quality control in the myocardium: cooperation between protein degradation and mitophagy." J Mol Cell Cardiol **75**: 122-30.

- Hanna, R. A., M. N. Quinsay, et al. (2012). "Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy." J Biol Chem **287**(23): 19094-104.
- Harper, J. W. and B. A. Schulman (2006). "Structural complexity in ubiquitin recognition." Cell **124**(6): 1133-6.
- Haynes, C. M. and D. Ron (2010). "The mitochondrial UPR - protecting organelle protein homeostasis." J Cell Sci **123**(Pt 22): 3849-55.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, et al. (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." J Biol Chem **277**(1): 432-8.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.
- Hershko, A., A. Ciechanover, et al. (1980). "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(4): 1783-6.
- Iguchi, M., Y. Kujuro, et al. (2013). "Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation." J Biol Chem **288**(30): 22019-32.
- Ii, K., H. Ito, et al. (1997). "Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly." J Neuropathol Exp Neurol **56**(2): 125-31.
- Ishikawa, A. and S. Tsuji (1996). "Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism." Neurology **47**(1): 160-6.
- Iwata, A., J. C. Christianson, et al. (2005). "Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13135-40.
- Jin, S. M., M. Lazarou, et al. (2010). "Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL." J Cell Biol **191**(5): 933-42.
- Johnson, F. and M. G. Kaplitt (2009). "Novel mitochondrial substrates of omi indicate a new regulatory role in neurodegenerative disorders." PLoS One **4**(9): e7100.
- Kamer, K. J. and V. K. Mootha (2015). "The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter." Nat Rev Mol Cell Biol **16**(9): 545-53.
- Kang, P. J., J. Ostermann, et al. (1990). "Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins." Nature **348**(6297): 137-43.
- Kaser, M. and T. Langer (2000). "Protein degradation in mitochondria." Semin Cell Dev Biol **11**(3): 181-90.
- Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2015). "Proteostasis and aging." Nat Med **21**(12): 1406-15.

- Kawabata, T. and T. Yoshimori (2015). "Beyond starvation: An update on the autophagic machinery and its functions." J Mol Cell Cardiol **95**: 2-10.
- Kazlauskaitė, A., C. Kondapalli, et al. (2014). "Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65." Biochem J **460**(1): 127-39.
- Kingston, R. E., C. A. Chen, et al. (2001). "Calcium phosphate transfection." Curr Protoc Immunol **Chapter 10**: Unit 10 13.
- Kirichok, Y., G. Krapivinsky, et al. (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." Nature **427**(6972): 360-4.
- Kitada, T., S. Asakawa, et al. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." Nature **392**(6676): 605-8.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-21.
- Koegl, M., T. Hoppe, et al. (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." Cell **96**(5): 635-44.
- Koll, H., B. Guiard, et al. (1992). "Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space." Cell **68**(6): 1163-75.
- Komander, D. (2009). "The emerging complexity of protein ubiquitination." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 937-53.
- Kopito, R. R. (2000). "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation." Trends Cell Biol **10**(12): 524-30.
- Koppen, M. and T. Langer (2007). "Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases." Crit Rev Biochem Mol Biol **42**(3): 221-42.
- Kravtsova-Ivantsiv, Y. and A. Ciechanover (2012). "Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation." J Cell Sci **125**(Pt 3): 539-48.
- Kroemer, G., G. Marino, et al. (2010). "Autophagy and the integrated stress response." Mol Cell **40**(2): 280-93.
- Langston, J. W., P. Ballard, et al. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science **219**(4587): 979-80.
- Lasorsa, F. M., P. Pinton, et al. (2003). "Recombinant expression of the Ca(2+)-sensitive aspartate/glutamate carrier increases mitochondrial ATP production in agonist-stimulated Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **278**(40): 38686-92.
- Lecker, S. H., A. L. Goldberg, et al. (2006). "Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." J Am Soc Nephrol **17**(7): 1807-19.
- Lee, S., S. Augustin, et al. (2011). "Electron Cryomicroscopy Structure of a Membrane-anchored Mitochondrial AAA Protease." Journal of Biological Chemistry **286**(6): 4404-4411.

- Lemus, L. and V. Goder (2014). "Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin." Cells **3**(3): 824-47.
- Lennox, G., J. Lowe, et al. (1989). "Diffuse Lewy body disease: correlative neuropathology using anti-ubiquitin immunocytochemistry." J Neurol Neurosurg Psychiatry **52**(11): 1236-47.
- Leonhard, K., B. Guiard, et al. (2000). "Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface." Mol Cell **5**(4): 629-38.
- Leroy, E., R. Boyer, et al. (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." Nature **395**(6701): 451-2.
- Liu, L., D. Feng, et al. (2012). "Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells." Nat Cell Biol **14**(2): 177-85.
- Liu, T., B. Lu, et al. (2004). "DNA and RNA binding by the mitochondrial lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate." J Biol Chem **279**(14): 13902-10.
- Livnat-Levanon, N. and M. H. Glickman (2011). "Ubiquitin-proteasome system and mitochondria - reciprocity." Biochim Biophys Acta **1809**(2): 80-7.
- Logan, C. V., G. Szabadkai, et al. (2014). "Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling." Nat Genet **46**(2): 188-93.
- Lucking, C. B., A. Durr, et al. (2000). "Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene." N Engl J Med **342**(21): 1560-7.
- Makarova, O., E. Kamberov, et al. (2000). "Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step." Biotechniques **29**(5): 970-2.
- Mallilankaraman, K., C. Cardenas, et al. (2012). "MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism." Nat Cell Biol **14**(12): 1336-43.
- Mallilankaraman, K., P. Doonan, et al. (2012). "MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cell survival." Cell **151**(3): 630-44.
- Mammucari, C., A. Raffaello, et al. (2016). "Molecular structure and pathophysiological roles of the Mitochondrial Calcium Uniporter." Biochim Biophys Acta **1863**(10): 2457-64.
- Margineantu, D. H., C. B. Emerson, et al. (2007). "Hsp90 inhibition decreases mitochondrial protein turnover." PLoS One **2**(10): e1066.
- Matsuda, N., S. Sato, et al. (2010). "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy." J Cell Biol **189**(2): 211-21.

- McBride, H. M., M. Neuspiel, et al. (2006). "Mitochondria: more than just a powerhouse." Curr Biol **16**(14): R551-60.
- McCormack, J. G. and R. M. Denton (1990). "Intracellular calcium ions and intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism in mammalian tissues." Proc Nutr Soc **49**(1): 57-75.
- McLelland, G. L., V. Soubannier, et al. (2014). "Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control." EMBO J **33**(4): 282-95.
- McNaught, K. S., C. W. Olanow, et al. (2001). "Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease." Nat Rev Neurosci **2**(8): 589-94.
- Mijaljica, D., M. Prescott, et al. (2007). "Different fates of mitochondria: alternative ways for degradation?" Autophagy **3**(1): 4-9.
- Moon, H. E. and S. H. Paek (2015). "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." Exp Neurobiol **24**(2): 103-16.
- Moran, M., D. Moreno-Lastres, et al. (2012). "Mitochondrial respiratory chain dysfunction: implications in neurodegeneration." Free Radic Biol Med **53**(3): 595-609.
- Mossmann, D., C. Meisinger, et al. (2012). "Processing of mitochondrial presequences." Biochim Biophys Acta **1819**(9-10): 1098-106.
- Murgia, M. and R. Rizzuto (2014). "Molecular diversity and pleiotropic role of the mitochondrial calcium uniporter." Cell Calcium **58**(1): 11-7.
- Nandi, D., P. Tahiliani, et al. (2006). "The ubiquitin-proteasome system." J Biosci **31**(1): 137-55.
- Narendra, D. P. and R. J. Youle (2011). "Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control." Antioxid Redox Signal **14**(10): 1929-38.
- Needham, P. G. and J. L. Brodsky (2013). "How early studies on secreted and membrane protein quality control gave rise to the ER associated degradation (ERAD) pathway: the early history of ERAD." Biochim Biophys Acta **1833**(11): 2447-57.
- Neutzner, A., G. Benard, et al. (2008). "Role of the ubiquitin conjugation system in the maintenance of mitochondrial homeostasis." Ann N Y Acad Sci **1147**: 242-53.
- Novak, I., V. Kirkin, et al. (2010). "Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance." EMBO Rep **11**(1): 45-51.
- O'Sullivan, S. S., D. R. Williams, et al. (2008). "Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study." Mov Disord **23**(1): 101-6.
- Ohsumi, Y. (2006). "Protein turnover." IUBMB Life **58**(5-6): 363-9.
- Okamoto, K. and J. M. Shaw (2005). "Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes." Annu Rev Genet **39**: 503-36.

- Ondrovicova, G., T. Liu, et al. (2005). "Cleavage site selection within a folded substrate by the ATP-dependent Lon protease." *J Biol Chem* **280**(26): 25103-10.
- Ottolini, D., T. Cali, et al. (2014). "Methods to measure intracellular Ca²⁺ fluxes with organelle-targeted aequorin-based probes." *Methods Enzymol* **543**: 21-45.
- Pagliarini, D. J., S. E. Calvo, et al. (2008). "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." *Cell* **134**(1): 112-23.
- Palty, R., W. F. Silverman, et al. (2010). "NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 436-41.
- Patron, M., V. Checchetto, et al. (2014). "MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity." *Mol Cell* **53**(5): 726-37.
- Paupe, V., J. Prudent, et al. (2015). "CCDC90A (MCUR1) is a cytochrome c oxidase assembly factor and not a regulator of the mitochondrial calcium uniporter." *Cell Metab* **21**(1): 109-16.
- Pendin, D., E. Greotti, et al. (2015). "Spying on organelle Ca²⁺(+) in living cells: the mitochondrial point of view." *J Endocrinol Invest* **38**(1): 39-45.
- Peng, J., D. Schwartz, et al. (2003). "A proteomics approach to understanding protein ubiquitination." *Nat Biotechnol* **21**(8): 921-6.
- Perier, C. and M. Vila (2012). "Mitochondrial biology and Parkinson's disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(2): a009332.
- Perocchi, F., V. M. Gohil, et al. (2010). "MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake." *Nature* **467**(7313): 291-6.
- Petrungaro, C., K. M. Zimmermann, et al. (2015). "The Ca²⁺-Dependent Release of the Mia40-Induced MICU1-MICU2 Dimer from MCU Regulates Mitochondrial Ca²⁺ Uptake." *Cell Metab* **22**(4): 721-33.
- Pickrell, A. M. and R. J. Youle (2015). "The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease." *Neuron* **85**(2): 257-73.
- Pinton, P., M. Brini, et al. (1998). "New light on mitochondrial calcium." *Biofactors* **8**(3-4): 243-53.
- Pinton, P., T. Pozzan, et al. (1998). "The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum." *EMBO J* **17**(18): 5298-308.
- Plovanich, M., R. L. Bogorad, et al. (2013). "MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling." *PLoS One* **8**(2): e55785.

- Powers, E. T., R. I. Morimoto, et al. (2009). "Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency." *Annu Rev Biochem* **78**: 959-91.
- Puck, T. T. and P. I. Marcus (1955). "A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production with Hela Cells in Tissue Culture: The Use of X-Irradiated Cells to Supply Conditioning Factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **41**(7): 432-7.
- Quiros, P. M., T. Langer, et al. (2015). "New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(6): 345-59.
- Radke, S., H. Chander, et al. (2008). "Mitochondrial protein quality control by the proteasome involves ubiquitination and the protease Omi." *J Biol Chem* **283**(19): 12681-5.
- Raffaello, A., D. De Stefani, et al. (2013). "The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit." *EMBO J* **32**(17): 2362-76.
- Ravikumar, B. and D. C. Rubinsztein (2004). "Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins?" *Neuroreport* **15**(16): 2443-5.
- Reinstein, E. and A. Ciechanover (2006). "Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection." *Ann Intern Med* **145**(9): 676-84.
- Riley, B. E., J. C. Loughheed, et al. (2013). "Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases." *Nat Commun* **4**: 1982.
- Rivett, A. J. (1990). "Eukaryotic protein degradation." *Curr Opin Cell Biol* **2**(6): 1143-9.
- Rizzuto, R., D. De Stefani, et al. (2012). "Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(9): 566-78.
- Rizzuto, R., P. Pinton, et al. (1998). "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses." *Science* **280**(5370): 1763-6.
- Rizzuto, R., A. W. Simpson, et al. (1992). "Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin." *Nature* **358**(6384): 325-7.
- Rodriguez-Arribas, M., S. M. Yakhine-Diop, et al. (2016). "Mitochondria-Associated Membranes (MAMs): Overview and Its Role in Parkinson's Disease." *Mol Neurobiol*.
- Rodriguez, M., C. Rodriguez-Sabate, et al. (2015). "Parkinson's disease as a result of aging." *Aging Cell* **14**(3): 293-308.
- Ross, C. A. and M. A. Poirier (2004). "Protein aggregation and neurodegenerative disease." *Nat Med* **10 Suppl**: S10-7.
- Rugarli, E. I. and T. Langer (2012). "Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons." *EMBO J* **31**(6): 1336-49.
- Sakata, E., Y. Yamaguchi, et al. (2003). "Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain." *EMBO Rep* **4**(3): 301-6.

- Sancak, Y., A. L. Markhard, et al. (2013). "EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex." Science **342**(6164): 1379-82.
- Santagata, S., D. Bhattacharyya, et al. (1999). "Molecular cloning and characterization of a mouse homolog of bacterial ClpX, a novel mammalian class II member of the Hsp100/Clp chaperone family." J Biol Chem **274**(23): 16311-9.
- Sarraf, S. A., M. Raman, et al. (2013). "Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization." Nature **496**(7445): 372-6.
- Sauve, V., A. Lilov, et al. (2015). "A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin." EMBO J **34**(20): 2492-505.
- Savitt, J. M., V. L. Dawson, et al. (2006). "Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine." J Clin Invest **116**(7): 1744-54.
- Scarffe, L. A., D. A. Stevens, et al. (2014). "Parkin and PINK1: much more than mitophagy." Trends Neurosci **37**(6): 315-24.
- Schneider, J. L. and A. M. Cuervo (2014). "Liver autophagy: much more than just taking out the trash." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **11**(3): 187-200.
- Seet, R. C., C. Y. Lee, et al. (2010). "Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers." Free Radic Biol Med **48**(4): 560-6.
- Shiba-Fukushima, K., Y. Imai, et al. (2012). "PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy." Sci Rep **2**: 1002.
- Shimura, H., N. Hattori, et al. (2000). "Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase." Nat Genet **25**(3): 302-5.
- Shin, J. H., H. S. Ko, et al. (2011). "PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease." Cell **144**(5): 689-702.
- Snider, J., G. Thibault, et al. (2008). "The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins." Genome Biol **9**(4): 216.
- Su, H. and X. Wang (2010). "The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective." Cardiovasc Res **85**(2): 253-62.
- Sulzer, D. (2007). "Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease." Trends Neurosci **30**(5): 244-50.
- Surmeier, D. J., J. N. Guzman, et al. (2011). "The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease." Neuroscience **198**: 221-31.
- Surmeier, D. J., P. T. Schumacker, et al. (2016). "Calcium and Parkinson's disease." Biochem Biophys Res Commun.

- Syntichaki, P. and N. Tavernarakis (2003). "The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?" Nat Rev Neurosci **4**(8): 672-84.
- Szopa, P., M. Dyzma, et al. (2013). "Membrane associated complexes in calcium dynamics modelling." Phys Biol **10**(3): 035004.
- Tal, M. C., M. Sasai, et al. (2009). "Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2770-5.
- Tatsuta, T., S. Augustin, et al. (2007). "m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria." EMBO J **26**(2): 325-35.
- Taylor, E. B. and J. Rutter (2011). "Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system." Biochem Soc Trans **39**(5): 1509-13.
- Taylor, S. W., E. Fahy, et al. (2003). "Characterization of the human heart mitochondrial proteome." Nat Biotechnol **21**(3): 281-6.
- Trempe, J. F., V. Sauve, et al. (2013). "Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation." Science **340**(6139): 1451-5.
- Twig, G., A. Elorza, et al. (2008). "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy." EMBO J **27**(2): 433-46.
- Varabyova, A., D. Stojanovski, et al. (2013). "Mitochondrial protein homeostasis." IUBMB Life **65**(3): 191-201.
- Voges, D., P. Zwickl, et al. (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." Annu Rev Biochem **68**: 1015-68.
- Wagner, I., H. Artl, et al. (1994). "Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria." EMBO J **13**(21): 5135-45.
- Wagner, S. A., P. Beli, et al. (2011). "A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles." Mol Cell Proteomics **10**(10): M111 013284.
- Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." Annu Rev Genet **39**: 359-407.
- Wang, H., P. Song, et al. (2011). "Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease." J Biol Chem **286**(13): 11649-58.
- Wang, N., M. R. Maurizi, et al. (1994). "Synthesis, processing, and localization of human Lon protease." J Biol Chem **269**(46): 29308-13.
- Wang, X., D. Winter, et al. (2011). "PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility." Cell **147**(4): 893-906.

- Wang, X. F., S. Li, et al. (2006). "Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease." Neurobiol Dis **23**(1): 198-205.
- Wehmer, M. and E. Sakata (2016). "Recent advances in the structural biology of the 26S proteasome." Int J Biochem Cell Biol.
- Wenzel, D. M., A. Lissounov, et al. (2011). "UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids." Nature **474**(7349): 105-8.
- Winklhofer, K. F. (2014). "Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle." Trends Cell Biol **24**(6): 332-41.
- Xu, P., D. M. Duong, et al. (2009). "Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation." Cell **137**(1): 133-45.
- Yadava, N. and D. G. Nicholls (2007). "Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone." J Neurosci **27**(27): 7310-7.
- Zhao, Q., J. Wang, et al. (2002). "A mitochondrial specific stress response in mammalian cells." EMBO J **21**(17): 4411-9.
- Zhou, P. (2004). "Determining protein half-lives." Methods Mol Biol **284**: 67-77.