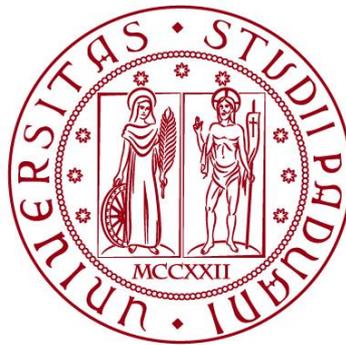


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

Studio del ruolo della proteina mitocondriale TMEM160 nella regolazione dell'omeostasi del calcio mitocondriale

Tutor: Prof.ssa Anna Raffaello

Dipartimento di Scienze Biomediche

Co-tutor: Dott. Donato D'Angelo

Dipartimento di Scienze Biomediche

Laureanda: Iris Haxhiu

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

SOMMARIO

1	ABSTRACT.....	5
2	STATO DELL'ARTE	6
2.1	RUOLO DEL CALCIO MITOCONDRIALE	6
2.2	STRUTTURA DEL COMPLESSO MCU	7
2.3	TMEM160.....	8
3	APPROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALE E METODI	10
3.1	COLTURE CELLULARI	10
3.2	TRASFEZIONE CELLULARE.....	10
3.3	LISI CELLULARE.....	11
3.4	QUANTIFICAZIONE PROTEICA	11
3.5	ELETTROFORESI DI PROTEINE SU GEL E WESTERN BLOT.....	12
3.6	RILEVAZIONE DI PROTEINE MEDIANTE ANTICORPI	12
3.7	MISURE DI Ca^{2+} MITOCONDRIALE	13
4	RISULTATI	15
4.1	ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI COMPONENTI DEL COMPLESSO MCU IN CELLULE HeLa IN CUI TMEM160 È OVERESPRESSO	15
4.2	MISURE DI Ca^{2+} MITOCONDRIALE IN CELLULE HeLa IN CUI TMEM160 È OVERESPRESSO 15	
4.3	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI TMEM160.....	16
4.4	ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI COMPONENTI DEL COMPLESSO MCU IN CELLULE HeLa IN CUI TMEM160 È SILENZIATO	16
4.5	MISURE DI Ca^{2+} MITOCONDRIALE IN CELLULE HeLa IN CUI TMEM160 È SILENZIATO ..	17
5	DISCUSSIONE.....	18
6	BIBLIOGRAFIA.....	20

1 ABSTRACT

Lo ione calcio (Ca^{2+}) svolge un importante ruolo di secondo messaggero all'interno della cellula. Per questo motivo, la sua concentrazione è finemente regolata nel tempo e nello spazio. Fluttuazioni della concentrazione fisiologica di questo ione innescano una serie di meccanismi cellulari, regolando numerosi effettori intracellulari. I mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi del calcio grazie all'uniporto del calcio mitocondriale (MCU), localizzato a livello della membrana mitocondriale interna. Nel laboratorio dove ho svolto l'internato di laurea è stata identificata l'identità molecolare di MCU attraverso uno studio bioinformatico che ha portato ad una lista di tredici proteine candidate, la funzione di molte delle quali rimane ancora poco studiata. Lo scopo di questo elaborato di laurea è lo studio del ruolo di una di esse, TMEM160, nella regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale. In particolare, esperimenti di overespressione e silenziamento di TMEM160 in cellule HeLa ed esperimenti di analisi proteica del complesso MCU e di determinazione dei livelli di Ca^{2+} nei mitocondri, hanno evidenziato come il silenziamento di questa proteina inibisca l'entrata di Ca^{2+} nei mitocondri. Inoltre, dai risultati ottenuti non si riscontrano cambiamenti con l'overespressione di TMEM160. Futuri studi saranno necessari per capire i meccanismi alla base di quanto osservato.

2 STATO DELL'ARTE

2.1 RUOLO DEL CALCIO MITOCONDRIALE

Lo ione calcio (Ca^{2+}) riveste un ruolo fondamentale come secondo messaggero in molti processi fisiologici quali la contrazione muscolare, l'induzione dell'apoptosi, la proliferazione, il differenziamento cellulare e il controllo della produzione di ATP. L'attivazione dei meccanismi regolati da questo ione dipende dalla variazione della sua concentrazione ($[\text{Ca}^{2+}]$) nel citoplasma delle cellule nel tempo e nello spazio; in particolare, la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmatica basale è di circa 100 nM, ma in seguito a segnali di attivazione cellulare la sua concentrazione può arrivare fino a 1 mM. Questo incremento è molto repentino e garantito dalla coordinazione di meccanismi di rilascio di calcio da depositi intracellulari e dalla sua entrata dallo spazio extracellulare, dove la sua concentrazione è di circa 1 mM [1]. Giocano un ruolo fondamentale di depositi intracellulari il reticolo endoplasmatico (RE) e il suo equivalente reticolo sarcoplasmatico (RS) nelle cellule del muscolo.

Il rilascio di ioni Ca^{2+} dal RE avviene ad opera del recettore dell'inositolo-1,4,5-trifosfato (IP_3). In aggiunta, nel RS il rilascio di Ca^{2+} avviene anche attraverso il recettore della rianodina (RyR). Quest'ultimo è un recettore presente a livello della membrana del RS ed è accoppiato meccanicamente ai recettori voltaggio-dipendenti della diidropiridina (DHP). I recettori dell' IP_3 sono ubiquitari e, grazie all'interazione con l' IP_3 , si aprono e fanno fuoriuscire il Ca^{2+} dal reticolo. L' IP_3 è prodotto della conversione enzimatica del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP_2) ad opera della fosfolipasi C che scinde il PIP_2 in IP_3 e diacilglicerolo (DAG) a seguito del legame di un ligando ai recettori accoppiati a proteine Gq (GPCR) (Fig. 1) [1].

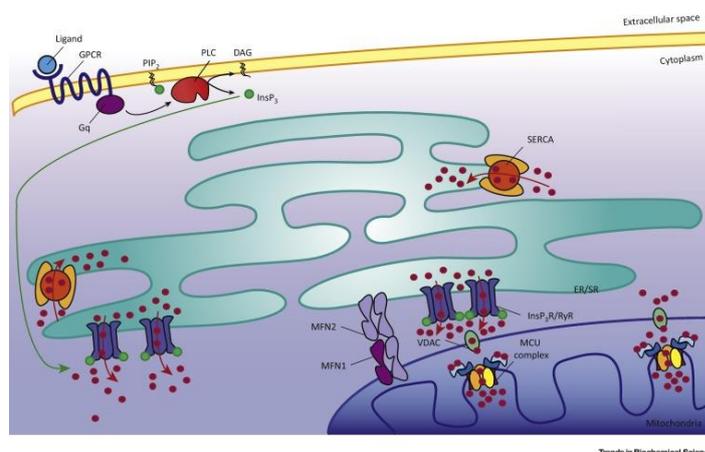


Figura 1 Rappresentazione dei meccanismi di rilascio di Ca^{2+} dal RE/RS attraverso il recettore per l' IP_3 e il RyR e di contatto tra mitocondrio e RE/RS (da Raffaello Anna et al. TIBS, 2016)

Per controllare finemente nel tempo la concentrazione di Ca^{2+} citosolica, sono necessari dei meccanismi di recupero del Ca^{2+} dal citoplasma per riportare la sua concentrazione a livelli basali. Giocano un ruolo fondamentale in questo processo

la pompa PMCA e lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sulla membrana plasmatica e la pompa SERCA sul RE/RS [3]. È stato dimostrato che il rilascio di Ca^{2+} dal RE/RS induce anche una parallela stimolazione all'entrata di Ca^{2+} nel mitocondrio. Questo è dovuto alla stretta vicinanza dei due organelli (Fig. 1) e al grande potenziale elettrochimico della membrana mitocondriale interna ($\Delta\Psi$), negativo all'interno. Il Ca^{2+} nel mitocondrio stimola l'attività di 3 deidrogenasi del ciclo di Krebs. In questo modo, la produzione di ATP è finemente regolata per fornire energia alle cellule stimulate. In condizioni di eccessivo accumulo di Ca^{2+} nel mitocondrio, si innesca l'apertura di un canale, chiamato poro di transizione della permeabilità che induce il rilascio nel citoplasma di fattori che innescano l'apoptosi [4].

2.2 STRUTTURA DEL COMPLESSO MCU

Mentre la membrana esterna mitocondriale è largamente permeabile al Ca^{2+} grazie alla presenza dei canali VDAC sempre aperti, l'accumulo di Ca^{2+} attraverso la membrana mitocondriale interna è mediato dall'uniporto del calcio mitocondriale (MCU).

La struttura di questo complesso è stata ampiamente caratterizzata e si è visto essere costituito da più subunità proteiche, tra cui le subunità che formano il poro MCU e la subunità dominante-negativa MCUB, la componente strutturale EMRE e le subunità regolatrici MICU1 e MICU2.

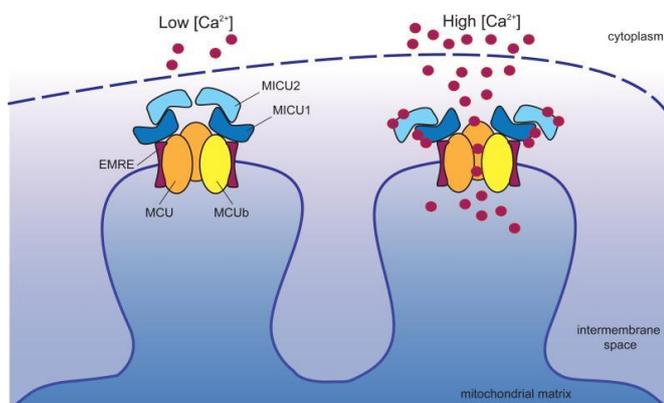


Figura 2 Rappresentazione schematica del complesso MCU (da Raffaello Anna et al. TIBS, 2016)

La subunità MCU che forma il poro del canale ha un peso molecolare di 40 kDa ed è costituita da 2 domini transmembrana (TM1 e TM2) separati da un piccolo loop esposto nello spazio intermembrana. Questo loop contiene il motivo altamente conservato "DIME" nel quale sono presenti amminoacidi carichi negativamente necessari per la captazione del Ca^{2+} . È stato dimostrato che il poro è formato da un tetramero di subunità MCU che generano il filtro di selettività per il Ca^{2+} [5].

MCUB è un'isoforma di MCU con la quale condivide il 50% della sequenza proteica. La sua funzione nella fisiopatologia non è ancora ben nota ma si è dimostrato che funge da subunità dominante-negativa incorporata nel complesso e ne riduce la sua attività. Inoltre, il rapporto MCU/MCUB varia molto da tessuto a

tessuto e questa potrebbe essere una possibile spiegazione del diverso accumulo di Ca^{2+} nei mitocondri di tessuti diversi.

Un aspetto importante è che l'ingresso di Ca^{2+} nel mitocondrio segue un andamento sigmoidale. Infatti, in assenza di stimolazione, la captazione del Ca^{2+} è inibita e viene rapidamente indotta in risposta a stimolazione cellulare che aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosolica. Questa peculiarità non può dipendere dalla subunità del poro MCU perché manca di domini *EF-hands* leganti il Ca^{2+} . È stato scoperto che la risposta sigmoidale al Ca^{2+} citosolico è mediata dalle due proteine regolatrici MICU1 e MICU2. Queste proteine paraloghe sono dotate di due domini *EF-hand* ciascuna che permettono loro di regolare l'apertura del canale MCU. Per quanto riguarda il meccanismo, a basse $[\text{Ca}^{2+}]$ citosoliche, i domini *EF-hands* non legano Ca^{2+} . In queste condizioni la subunità inibitoria MICU2 è attiva e il canale è chiuso. A seguito dell'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]$ citosolica i domini *EF-hands* legano Ca^{2+} e questo determina l'inattivazione della subunità inibitoria MICU2 e la concomitante attivazione della subunità attivatoria MICU1, permettendo quindi l'apertura del canale [5].

La subunità EMRE è stata l'ultima ad essere identificata ed è stato dimostrato essere un regolatore essenziale per il corretto assemblamento e funzionamento del complesso. Infatti, il silenziamento di EMRE inibisce l'assemblaggio del canale e quindi induce una diminuzione dell'ingresso di Ca^{2+} nel mitocondrio.

2.3 TMEM160

Nel laboratorio dove ho svolto l'internato di laurea, nel 2011 è stata identificata l'identità molecolare dell'uniporto del calcio mitocondriale (MCU) [6] attraverso uno screening bioinformatico che ha portato ad una lista di 14 possibili proteine candidate. Fra queste è stato identificato MCU, mentre altre proteine sono state caratterizzate negli anni successivi. Tuttavia, alcune proteine di questa lista sono ancora poco studiate e lo scopo del mio internato di laurea è stato caratterizzare una di queste proteine, transmembrane protein 160 (TMEM160), in relazione ad un suo possibile ruolo nell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale (Fig. 3)

Accession	Description
NP_062788	HIG1 domain family member 1A
NP_079736	transmembrane protein 126A
NP_510963	growth hormone-inducible transmembrane protein
NP_080638	transmembrane protein C9orf46 homolog
NP_079984	transmembrane protein 186
NP_904328	NADH dehydrogenase subunit 1
NP_904337	NADH dehydrogenase subunit 4
NP_904339	NADH dehydrogenase subunit 6
NP_081214	transmembrane protein 160
NP_780421	transmembrane protein 65
NP_081406	AFG3-like protein 2
XP_001478993	PREDICTED: NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5-like
NP_001028431	coiled-coil domain-containing protein 109A
NP_077235	transmembrane protein C3orf1 homolog

Figura 3 Lista delle proteine candidate ad essere l'uniporto del calcio mitocondriale (De Stefani, Raffaello et al., Nature, 2011)

La sua struttura tridimensionale non è ancora pienamente nota ma si sa essere costituita da tre α -eliche che con relativa convinzione saranno le strutture che si dispongono all'interno della membrana (Fig. 4) [7]. Sappiamo inoltre essere codificata dall'omonimo gene *TMEM160*, che nell'uomo si trova nel cromosoma 19.

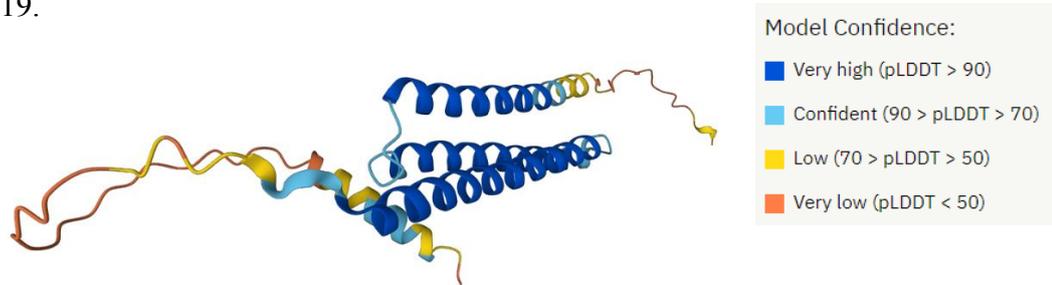


Figura 4 Struttura tridimensionale di TMEM160

Poco è noto del ruolo fisiopatologico di TMEM160. Recentemente è stato dimostrato che il silenziamento di questa proteina induca un aumento delle proteine legate alla risposta allo stress mitocondriale, quali chaperoni mitocondriali, e un significativo aumento nella generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questo studio evidenzia, dunque, come TMEM160 possa avere un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi mitocondriale, nel sopprimere la generazione di ROS e stabilizzare le proteine mitocondriali e la loro struttura tridimensionale [8]. Studi futuri saranno necessari per comprendere meglio il ruolo fisiopatologico di questa proteina.

3 APPROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALE E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

Per tutti gli esperimenti sono state utilizzate cellule HeLa, mantenute in incubatore a 37 °C in 5% CO₂, in fiasche da 75 cm². Il terreno di coltura utilizzato è DMEM addizionato di glucosio e piruvato, con aggiunta del 10% di siero fetale bovino (FBS) e 100 U/ml di Penicillina-Streptomicina.

3.2 TRASFUZIONE CELLULARE

Per la trasfezione cellulare, $1,5 \times 10^5$ cellule sono state piastrate in ogni pozzetto di piastre da 6 pozzetti. Il giorno successivo, le cellule sono state trasfettate mediante il metodo del calcio fosfato, con DNA plasmidico codificante per TMEM160 con l'aggiunta di un FLAG tag e con siRNA specifici per il silenziamento di TMEM160. Inoltre, per le misurazioni di Ca²⁺, le cellule sono state co-trasfettate con un plasmide codificante per l'equorina. Quest'ultima, infatti, è in grado di legare ioni Ca²⁺ ed emettere, come conseguenza, fotoni di luce [9, 10].

Le soluzioni utilizzate per la trasfezione sono le seguenti:

- CaCl₂ 2.5 M, conservato a -20 °C fino all'utilizzo;
- HEPES Buffered Solution 2X (HBS): 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH=7.18.

Per ogni pozzetto sono state preparate due soluzioni:

- la prima contenente 8 µg totali di DNA plasmidico (oppure 1 pg di siRNA) disciolto in 90 µl di H₂O sterile;
- la seconda contenente 100 µl di HBS 2X.

Alla prima soluzione sono stati aggiunti 10 µl di CaCl₂ 2.5 M. Tale soluzione è stata poi aggiunta, goccia a goccia, ai 100 µl di HBS 2X, in agitazione.

In questo modo, si creano dei precipitati di calcio fosfato che legano le molecole di DNA o di siRNA. Tali precipitati si legano a loro volta alle cellule bersaglio, permettendo l'ingresso del DNA o del siRNA al loro interno.

La soluzione finale è stata aggiunta al pozzetto dopo un tempo d'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo sei ore le cellule sono state lavate con PBS in modo tale da rimuovere i precipitati.

3.3 LISI CELLULARE

Per effettuare la lisi cellulare in ogni pozzetto è stato rimosso il terreno di coltura e sono stati svolti due lavaggi in PBS. Successivamente, le cellule sono state staccate dal pozzetto tramite uno “scraper”, raccolte in 1 mL di PBS e centrifugate per 5 minuti a 300 xg. Dopo aver aspirato il surnatante, il pellet cellulare è stato risospeso in RIPA buffer (Tabella 1).

Buffer RIPA
140 mM NaCl
10 mM Tris HCl, pH 8
1 mM EDTA
0.5 mM EGTA
1% Triton X-100
0.1% sodio desossicolato
0.1% sodio dodecilsolfato
Inibitore di proteasi e fosfatasi 1X

Tabella 1 Composizione del buffer RIPA

La lisi avviene per 30 minuti in ghiaccio, vortexando ogni 10 minuti per aiutare il processo. Successivamente, i lisati cellulari sono stati centrifugati per 10 minuti alla massima velocità a 4 °C. Al termine della centrifuga, il surnatante, contenente il lisato proteico, è stato raccolto in una provetta pulita.

3.4 QUANTIFICAZIONE PROTEICA

Il metodo utilizzato per la quantificazione proteica è il saggio colorimetrico BCA (acido bicinconinico). Questo metodo è costituito da due passaggi. Nel primo, le proteine, in ambiente alcalino, sono in grado di ridurre il Cu^{2+} a Cu^+ . Nel secondo avviene la chelazione di due molecole di BCA con uno ione Cu^+ , portando alla formazione di un prodotto color indaco, che assorbe alla lunghezza d'onda di 563 nm. Tale assorbanza è proporzionale alla concentrazione proteica. Per calcolare la concentrazione proteica esatta dei campioni, viene costruita una retta di taratura con diluizioni scalari di albumina di siero bovino (BSA). Per ridurre eventuali errori di misurazione, per ogni campione sono state effettuate tre misurazioni.

3.5 ELETTROFORESI DI PROTEINE SU GEL E WESTERN BLOT

Dopo aver effettuato la quantificazione dei lisati proteici, i campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide 4-12% in condizioni denaturanti. In questo modo, le proteine vengono separate in base al loro peso molecolare. Per ogni campione si è preparata la seguente soluzione:

- 20 µg di lisato proteico;
- 100 mM 1,4-Ditiotreitolo (DTT);
- Loading Buffer (LB) 1X contenente glicerolo e colorante;
- H₂O fino a raggiungere un volume finale di 20 µl.

Prima della corsa elettroforetica, i campioni sono stati denaturati a 95 °C per 5 minuti. La corsa è stata effettuata al voltaggio costante di 120 V a temperatura ambiente per circa due ore. L'applicazione di un campo elettrico permette alle proteine, cariche negativamente, di migrare verso il catodo con una velocità che dipende dal loro peso molecolare.

Successivamente, le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa. In particolare, il trasferimento è stato eseguito col metodo semi-dry. Questo metodo prevede la disposizione su un apposito strumento di trasferimento di un cartoncino, sul quale si posiziona la membrana di nitrocellulosa, il gel e un altro cartoncino. Tutti questi componenti sono stati ben imbevuti in un buffer di trasferimento (10 v/v metanolo, 25 mM Tris-HCl, 0.2 M glicina, pH=8.5).

Il trasferimento è stato effettuato ad un voltaggio costante di 23 V per 50 minuti a temperatura ambiente. Per valutare la qualità del trasferimento, la membrana è stata immersa in una soluzione di Red Ponceau (0.1% in 1% acido acetico). Tale colorante si lega ai gruppi amminici delle proteine, permettendo di evidenziare le bande proteiche sulla membrana.

Successivamente, la membrana è stata incubata in agitazione per un'ora a temperatura ambiente in una soluzione di bloccaggio composta da 5% p/v di latte in polvere sciolto in TBS (50 mM tris-HCl pH=7.5, 150 mM NaCl) con aggiunta dello 0.1% di Tween. Questa soluzione previene i legami non specifici dell'anticorpo primario che verrà successivamente aggiunto, perché la miscela di proteine contenuta nel latte satura i siti liberi sulla membrana.

3.6 RILEVAZIONE DI PROTEINE MEDIANTE ANTICORPI

Gli anticorpi primari utilizzati sono un anti-FLAG (per visualizzare TMEM160), le diverse proteine che compongono il complesso MCU (MCU, MICU1, MICU2, EMRE), e GRP75, utilizzato come normalizzatore in quanto espresso in modo costante fra le diverse condizioni analizzate. Gli anticorpi primari utilizzati, e la loro diluizione, sono illustrati nella Tabella 2.

Anticorpi primari	Diluizione
anti-MCU	1:1000
anti-MICU1	1:1000
anti-MICU2	1:1000
anti-EMRE	1:1000
anti-FLAG	1:1000
anti-GRP75	1:1000

Tabella 2 Anticorpi primari usati e loro diluizione

L'anticorpo primario viene lasciato in incubazione a 4 °C per tutta la notte. Il giorno successivo sono stati effettuati tre lavaggi con TBS + 0.1% Tween, della durata di 5 minuti ciascuno, in modo tale da rimuovere l'eccesso di anticorpo primario non legato alla proteina di interesse. Il passaggio successivo è stato l'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano (HRP), diluito 1:5000 in 5% latte in TBS + 0.1% Tween, che lega l'anticorpo primario. L'incubazione avviene per un'ora in agitazione a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario sono stati effettuati tre lavaggi con TBS + 0.1% Tween di 5 minuti ciascuno.

Gli anticorpi secondari sono stati visualizzati tramite la tecnica *Enhanced ChemiLuminescence*, in cui la perossidasi HRP legata all'anticorpo secondario, in presenza di composti fenolici che fungono da promotori chimici e in condizioni alcaline ossidano il luminolo. Quest'ultimo, da ossidato si trova in uno stato di eccitazione e ritorna allo stato fondamentale tramite l'emissione di fotoni. Con questo metodo, l'intensità della banda visualizzata è direttamente proporzionale alla quantità di proteina di interesse. In questo modo, tenendo conto di aver caricato la stessa quantità di proteine per ogni campione e del normalizzatore usato, è possibile fare un confronto quantitativo fra i campioni di interesse.

3.7 MISURE DI Ca^{2+} MITOCONDRIALE

Le misurazioni di Ca^{2+} mitocondriale sono state effettuate mediante la trasfezione delle cellule (piastrate il giorno prima in una piastra di 96 pozzetti, 40×10^5 per ogni pozzetto) con un plasmide esprime la proteina luminescente equorina contenente un segnale di localizzazione mitocondriale, che consente di effettuare misurazioni di Ca^{2+} specifiche per questo compartimento cellulare.

L'equorina è in grado di legare lo ione Ca^{2+} grazie alla presenza di tre domini *EF-hand*. La sonda per essere funzionale ha bisogno, oltre alla apo-proteina equorina, di uno specifico gruppo prostetico, la celenterazina, con la quale reagisce in presenza di ossigeno molecolare. In particolare, il legame del Ca^{2+} all'equorina causa l'ossidazione irreversibile della celenterazina a celenteramide, con conseguente emissione di CO_2 ed emissione di fotoni di luce.

24 ore dopo la trasfezione, l'equorina viene ricostituita con il gruppo prostetico celenterazina alla concentrazione di 5 μM , per la durata di un'ora, per poi procedere con l'esperimento. Scaduto il tempo d'incubazione, la celenterazina è stata rimossa

e sono stati aggiunti in ogni pozzetto 70 μl di Krebs-Ringer modified buffer (135 mM NaCl, 5.5 mM glucosio, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 0.4 mM K_2HPO_4 , 20 mM HEPES, pH=7.4).

Durante la misurazione viene prima iniettato uno stimolo in grado di indurre il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico nel citosol e che induce di conseguenza ingresso di questo ione nel mitocondrio. Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato istamina 100 μM . Successivamente è stata aggiunta una soluzione contenente digitonina e Ca^{2+} , per permeabilizzare le cellule e i mitocondri. Questo trattamento fornisce una misura dell'equorina totale presente nei mitocondri e permette quindi di normalizzare il segnale di Ca^{2+} per l'efficienza di trasfezione.

I dati sono stati calibrati e analizzati tramite un custom-made Excel workbook. In particolare, l'emissione di luce è proporzionale al quadrato della concentrazione di Ca^{2+} , questo per la cooperatività dei tre siti *EF-hand* dell'equorina. La luminosità viene convertita in concentrazione di Ca^{2+} usando l'algoritmo di Allen e Blink.

4 RISULTATI

4.1 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI COMPONENTI DEL COMPLESSO MCU IN CELLULE HELa IN CUI TMEM160 È OVERESPRESSO

Nella prima parte del mio tirocinio di laurea mi sono occupata di analizzare possibili cambiamenti nei livelli proteici dei componenti del complesso MCU in seguito all'overespressione di TMEM160, mediante la tecnica del Western blot.

Nella figura 5 è possibile osservare la corretta overespressione di TMEM160, tramite la visualizzazione del tag FLAG. Non si osservano cambiamenti nella forma matura di MCU (banda più bassa), mentre vi è un aumento nel suo precursore che non ha ancora subito il taglio proteolitico della sequenza di localizzazione mitocondriale (banda più alta). L'espressione di MICU2 non cambia con l'overespressione di TMEM160, mentre vi è una diminuzione di MICU1 e un aumento di EMRE.

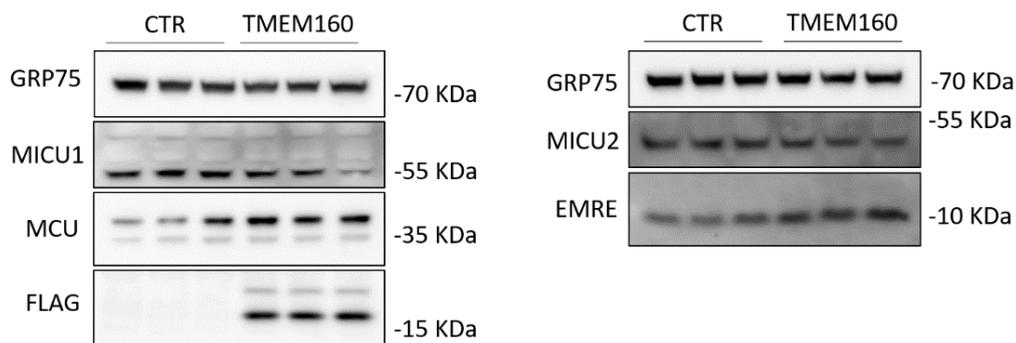


Figura 5 Componenti del complesso MCU in cellule HeLa con overespressione di TMEM160

Il normalizzatore scelto, GRP75, non varia fra le diverse condizioni, attestando il caricamento omogeneo dei campioni.

4.2 MISURE DI Ca^{2+} MITOCONDRIALE IN CELLULE HELa IN CUI TMEM160 È OVERESPRESSO

Considerati i cambiamenti osservati nei livelli proteici della forma precursore di MCU, in MICU1 ed EMRE, sono state condotte misure di Ca^{2+} mitocondriale in cellule HeLa in cui è stato overespresso TMEM160. L'ingresso di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale è stato misurato in seguito a stimolazione con istamina. I nostri risultati mostrano che l'overespressione di TMEM160 non provoca cambiamenti nell'ingresso di Ca^{2+} mitocondriale (Fig. 6).

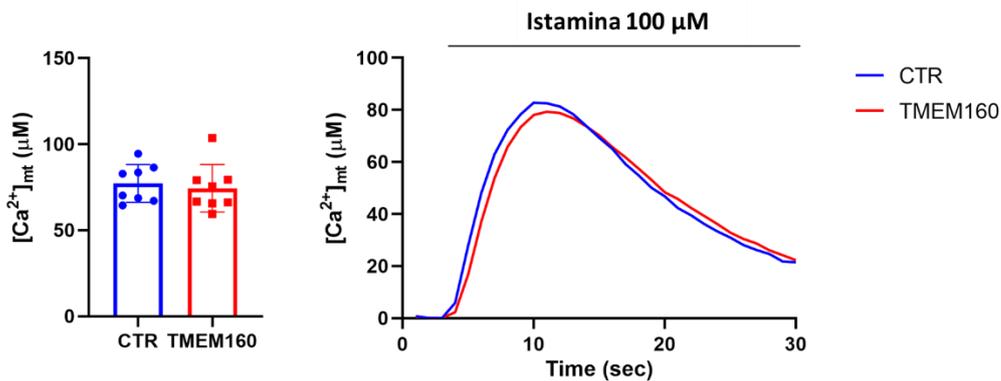


Figura 6 Misure di Ca^{2+} mitocondriale in seguito ad overespressione di TMEM160

4.3 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI TMEM160

Successivamente è stato analizzato lo scenario opposto, ovvero come il silenziamento di TMEM160 influenzi l'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale. Per prima cosa è stato analizzato il corretto silenziamento della proteina di interesse in cellule HeLa. Non avendo a disposizione un anticorpo specifico per TMEM160, è stato necessario trasfettare le cellule sia con il siRNA di controllo o il siRNA specifico per TMEM160 sia con il plasmide codificante per TMEM160 con l'aggiunta del tag FLAG. In questo modo è possibile visualizzare l'efficienza di silenziamento monitorando l'espressione di TMEM160-flag sia nelle cellule trasfettate con un siRNA di controllo sia in quelle trasfettate con il siRNA di TMEM160. Come è possibile osservare nella figura 7, il silenziamento di TMEM160 avviene in modo efficace.

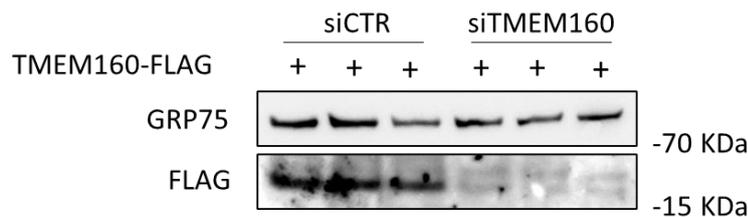


Figura 7 Validazione del silenziamento di TMEM160

4.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEI COMPONENTI DEL COMPLESSO MCU IN CELLULE HELa IN CUI TMEM160 È SILENZIATO

Sono stati analizzati i livelli proteici dei diversi componenti del complesso MCU in cellule trattate con i siRNA specifici per TMEM160 (Fig. 8).

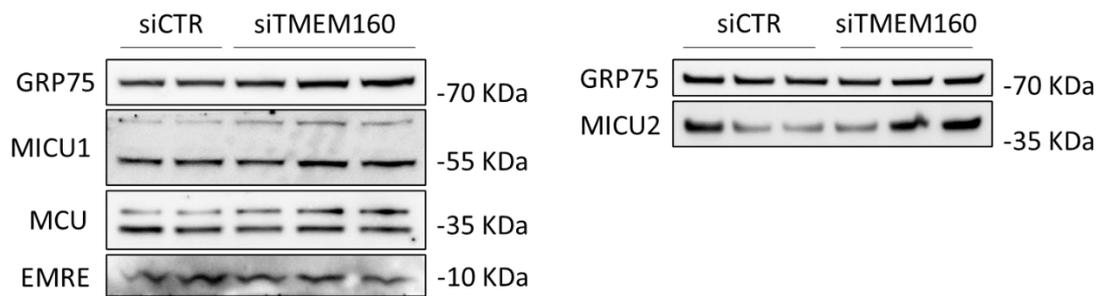


Figura 8 Componenti del complesso MCU in cellule HeLa con silenziamento di TMEM160

In questo caso non si osservano cambiamenti significativi nell'espressione di MCU, MICU1, MICU2 ed EMRE. GRP75 è stato utilizzato come normalizzatore fra le diverse condizioni.

4.5 MISURE DI Ca^{2+} MITOCONDRIALE IN CELLULE HELa IN CUI TMEM160 È SILENZIATO

Successivamente, sono state condotte misure di Ca^{2+} mitocondriale in cellule HeLa in cui l'espressione di TMEM160 è stata silenziata. Anche in questo caso le cellule sono state stimolate con istamina. Contrariamente a quanto osservato con l'overespressione di TMEM160, il suo silenziamento induce una diminuzione significativa nei livelli di Ca^{2+} mitocondriale (Fig. 9).

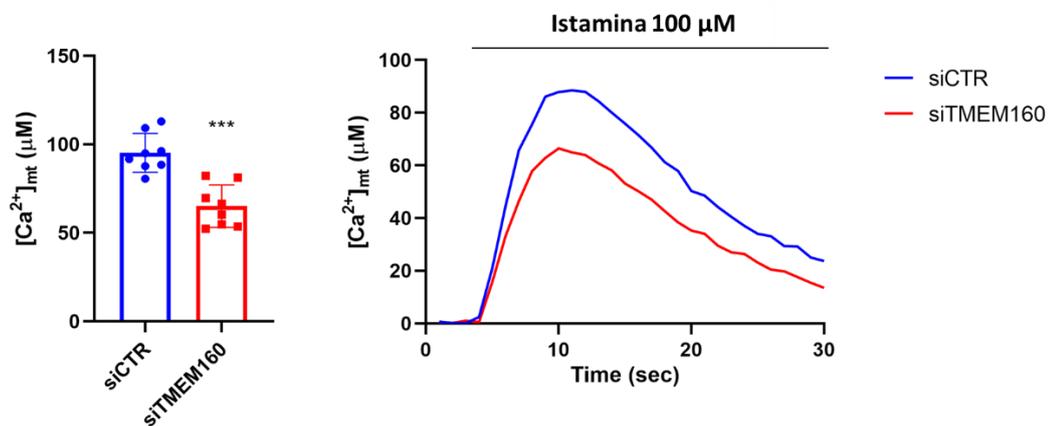


Figura 9 Misure di Ca^{2+} mitocondriale in seguito al silenziamento di TMEM160

5 DISCUSSIONE

Gli ioni Ca^{2+} svolgono un importante ruolo di secondo messaggero nelle cellule, regolando vari processi fisiologici, come la plasticità sinaptica, la contrazione muscolare, la proliferazione e la morte cellulare. In questo contesto i mitocondri svolgono un ruolo centrale, grazie alla loro capacità di fare entrare Ca^{2+} nella matrice mitocondriale in seguito ad un aumento della concentrazione di Ca^{2+} nel citosol [1, 2].

L'ingresso di Ca^{2+} nel mitocondrio è reso possibile dalla differenza di potenziale elettrochimico negativo (-180 mV) della matrice mitocondriale e dalla presenza del complesso dell'uniporto del calcio mitocondriale (MCU). Questo complesso proteico si localizza a livello della membrana mitocondriale interna ed è composto da diverse subunità. In particolare, si distinguono le subunità formanti il poro, MCU e la sua forma dominante-negativa MCU_b , le subunità regolatrici MICU1 e MICU2, e la proteina strutturale EMRE, che si ritiene essere fondamentale per il corretto assemblaggio del complesso [3].

Lo scopo del mio tirocinio di laurea è stato quello di caratterizzare il possibile ruolo nell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale di TMEM160, una delle 14 proteine candidate ad essere l'uniporto del Ca^{2+} mitocondriale in uno dei due studi che ne ha identificato l'identità molecolare [6]. Tuttavia, la funzione di questa proteina, poco caratterizzata da un punto di vista funzionale, rimane ad oggi sconosciuta.

Per comprendere il suo possibile ruolo nella regolazione del Ca^{2+} mitocondriale, ho svolto degli esperimenti di overespressione e silenziamento di TMEM160, in cellule HeLa, per poi analizzare i livelli proteici dei diversi componenti del complesso MCU e le variazioni nell'entrata di Ca^{2+} mitocondriale in seguito a stimolazione con istamina.

I dati mostrano come l'overespressione di TMEM160 non causi delle variazioni nell'entrata di Ca^{2+} mitocondriale in seguito a stimolazione, nonostante l'aumento dei livelli proteici di EMRE e una leggera diminuzione in quelli di MICU1.

Il silenziamento di TMEM160, invece, causa una diminuzione nell'entrata di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale in seguito a stimolazione. Tuttavia, a questa diminuzione non si associano cambiamenti nei livelli proteici dei diversi componenti del complesso.

I risultati ottenuti, sebbene preliminari, evidenziano un possibile ruolo di TMEM160 nell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale. Altri studi, fra i quali l'analisi del potenziale di membrana mitocondriale, saranno necessari per comprendere perché il suo silenziamento causi una diminuzione dell'entrata di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale.

Più in generale, è evidente la necessità di ampliare le nostre conoscenze riguardo la funzione di TMEM160 all'interno del mitocondrio. Oltre alla caratterizzazione del

ruolo di TMEM160 nel suo contesto fisiologico, studi preliminari hanno dimostrato una correlazione tra il silenziamento di TMEM160 e l'aumento nella generazione di specie reattive dell'ossigeno ROS [8]. Sarà quindi interessante capire se si trovano delle mutazioni nel gene di TMEM160 in specifici contesti patologici.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] Berridge, M., Lipp, P. & Bootman, M. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11–21 (2000). <https://doi.org/10.1038/35036035>
- [2] Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29. doi: 10.1038/nrm1155. PMID: 12838335.
- [3] Raffaello A, Mammucari C, Gherardi G, Rizzuto R. Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem Sci*. 2016 Dec;41(12):1035-1049. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.001. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27692849; PMCID: PMC5123979.
- [4] Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566–578 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- [5] S. Feno, R. Rizzuto, A. Raffaello, D. Vecellio Reane, The molecular complexity of the Mitochondrial Calcium Uniporter, *Cell Calcium*. 93 (2021) 102322. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102322>.
- [6] De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E. *et al.* A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 336–340 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10230>
- [7] AlphaFold Protein Structure Database <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9D938>
- [8] Yamashita K, Haraguchi M, Yano M. Knockdown of TMEM160 leads to an increase in reactive oxygen species generation and the induction of the mitochondrial unfolded protein response. *FEBS Open Bio*. 2022 Dec;12(12):2179-2190. doi: 10.1002/2211-5463.13496. Epub 2022 Oct 20. PMID: 36217717; PMCID: PMC9714381.
- [9] Granatiero V, Patron M, Tosatto A, Merli G, Rizzuto R. The use of aequorin and its variants for Ca²⁺ measurements. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014 Jan 1;2014(1):9-16. doi: 10.1101/pdb.top066118. PMID: 24371311.
- [10] P. Pinton, A. Rimessi, A. Romagnoli, A. Prandini, R. Rizzuto, Biosensors for the detection of calcium and pH., *Methods Cell Biol*. 80 (2007) 297–325. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80015-4)