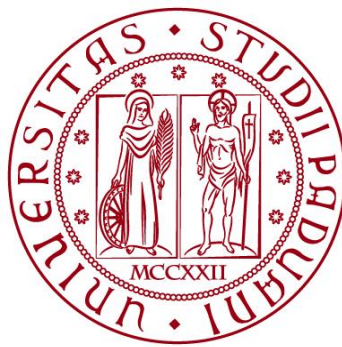


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Analisi degli effetti della composizione del cibo
sulla capacità di DJ-1 di modulare l'autofagia in
*Drosophila melanogaster***

**Tutor: Prof. Marco Bisaglia
Dipartimento di Biologia
Co-tutor: Dr. Francesco Agostini**

Laureanda: Nicole Zerlotto

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Abstract

L'elaborato riguarda la comprensione degli effetti della composizione del cibo sulla capacità della proteina DJ-1 di modulare l'autofagia nell'organismo modello *Drosophila melanogaster*. L'autofagia è un meccanismo che risulta compromesso in diverse patologie umane, incluse malattie neurodegenerative, tumori e disturbi metabolici. La comprensione del ruolo di DJ-1 nella regolazione del processo autofagico può fare chiarezza sui meccanismi cellulari alla base di tali patologie.

DJ-1 è una proteina codificata dal gene PARK7 (o DJ-1) coinvolta in diversi processi cellulari, tra cui regolazione trascrizionale e mantenimento dell'omeostasi mitocondriale, oltre a svolgere attività di chaperone, di proteasi e di *scavenger* verso specie reattive dell'ossigeno (ROS). La rilevanza di questa proteina è anche confermata dal fatto che una perdita o compromissione della sua attività sono correlate a una forma genetica della Malattia di Parkinson. Malgrado gli sforzi della ricerca scientifica per caratterizzare il ruolo di questa proteina, la precisa funzione di DJ-1 non è ancora stata completamente chiarita. Per questo motivo, il nostro laboratorio si è occupato della caratterizzazione dell'attività di DJ-1 in vivo, grazie all'utilizzo di *Drosophila melanogaster*. In questo organismo modello è stato precedentemente dimostrato che DJ-1 partecipa al mantenimento dell'omeostasi mitocondriale e alla regolazione della corretta attività autofagica. Inoltre, si è osservato che l'attività di DJ-1 influisce sulle importanti vie di segnale molecolare che sono coinvolte nei meccanismi di comunicazione organello-organello, nello specifico, tra mitocondri e lisosomi, a conferma del ruolo di questa proteina a livello di diversi compartimenti cellulari. In particolare, il nostro laboratorio ha osservato il coinvolgimento di DJ-1 nella regolazione del pathway modulato dalle chinasi AMPK e mTOR. Considerando che sia l'attività di mTOR che l'autofagia sono fortemente regolati dalla disponibilità di nutrienti, in particolare di aminoacidi, è stato ipotizzato che DJ-1 potesse essere coinvolta nella regolazione del metabolismo degli aminoacidi, modulando la concentrazione cellulare di queste molecole e, di conseguenza, l'autofagia.

A conferma di questa ipotesi, è stato anche osservato che moscerini knock-out (KO) per la proteina DJ-1 risultano essere più sensibili e meno resistenti al digiuno rispetto ad organismi wild-type. La condizione di digiuno, infatti, è uno stimolo noto per indurre

fortemente l'autofagia, che viene attivata laddove la disponibilità di nutrienti diminuisce, per ripristinare i nutrienti di cui la cellula necessita. Questo dato rappresenta una conferma del coinvolgimento di DJ-1 nella risposta a questo tipo di stress e, per esteso, nella regolazione autofagica.

Per comprendere se ci fosse una relazione tra l'attività di DJ-1 e la concentrazione di aminoacidi, è stato pensato di far nascere moscerini in pappe specifiche, rispettivamente senza aminoacidi e senza carboidrati, e di sottoporle successivamente a digiuno, al fine di comprendere se le differenze di sopravvivenza che si osservano tra moscerini KO per DJ-1 e moscerini wild-type permangono o risultano variate.

Anche se l'interpretazione non risulta semplice, i dati ottenuti sembrano indicare la possibilità che i controlli riescano ad adottare strategie più efficaci di recupero di nutrienti grazie alla presenza di DJ-1, a conferma della sua implicazione nel metabolismo energetico associato agli aminoacidi. Verranno prese in considerazione, all'interno della conclusione, vie alternative o ipotesi di sperimentazioni future per corroborare i risultati ottenuti da questi esperimenti e supportare i dati acquisiti.

INDICE

<i>1. INTRODUZIONE</i>	7
1.1 DJ-1: ruolo fisiologico	7
1.2 DJ-1: omeostasi autofagica e mitocondriale	11
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> come organismo modello	16
1.4 Conseguenze della perdita di funzione di DJ-1	16
<i>2. SCOPO DELLO STUDIO</i>	21
<i>3. MATERIALI E METODI</i>	23
3.1 Ceppi di <i>Drosophila melanogaster</i> e mantenimento dei moscerini	23
3.2 Tipologie di pappe di crescita	23
3.3 Analisi dei dati	24
<i>4. RISULTATI</i>	25
<i>5. DISCUSSIONE</i>	27
<i>6. BIBLIOGRAFIA</i>	29

1. INTRODUZIONE

La proteina DJ-1, codificata dal gene *PARK7* (o *DJ-1*), rappresenta ancora un oggetto di studio enigmatico all'interno della comunità scientifica dal momento che il suo preciso ruolo fisiologico risulta ad oggi ambiguo. Laddove la sua espressione risulti alterata, però, si conosce con precisione l'innescò di una serie di cascate di segnalazione che conducono a patologie che includono neurodegenerazione, tumori, infarto e disturbi infiammatori. All'interno del capitolo corrente, verranno presentati i diversi ruoli che la proteina sembra svolgere nell'ambito del metabolismo cellulare per poterne poi capire le conseguenze della sua mancata integrità nell'organismo modello *Drosophila melanogaster*. Nello specifico, verrà presa in esame la funzione esercitata dalla proteina nel contesto dell'attività autofagica e il conseguente squilibrio della stessa quando la presenza di DJ-1 viene a mancare.

1.1 DJ-1: ruolo fisiologico

Il gene *PARK7*, localizzato nel cromosoma 1, possiede le informazioni genetiche per la trascrizione della proteina DJ-1, conosciuta anche come Parkinson disease protein 7, riscontrabile ubiquitariamente in molteplici tessuti e organi, inclusa l'area cerebrale¹. DJ-1 è prevalentemente localizzata a livello del citoplasma ma risulta espressa seppur in quantità piuttosto basse anche nel nucleo o in altri compartimenti cellulari quali il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi o i mitocondri². Il gene DJ-1 fu scoperto inizialmente come oncogene in associazione al gene H-ras nel 1997³ e in seguito, nel 2003, venne descritto come gene causativo di una forma familiare della malattia di Parkinson (da cui park7). A seguito della scoperta di DJ-1 come gene associato allo sviluppo di tumori e disturbi neurodegenerativi, la ricerca si è estesa ampiamente e più di un migliaio di studi che indagano i ruoli molteplici della proteina sono stati pubblicati⁴.

DJ-1 è stata suggerita appartenere alla famiglia delle peptidasi C56 e risulta funzionale sotto forma di omodimero, come dimostrato da riscontri strutturali e biochimici⁵.

¹ Medlineplus, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), [last updated May 1, 2012]

² Bonifati et al. 2003, Miller et al. 2003, Canet-Avilés et al. 2004

³ Nagakubo et al., 1997

⁴ Ariga H., 2017

⁵ Sun Mo E., 2023

La superfamiglia a cui DJ-1 sembrerebbe appartenere è rappresentata da un gruppo di proteine diversificato strutturalmente e funzionalmente presente nella maggior parte degli organismi, che include proteine chaperone, proteasi e proteine di risposta allo stress⁶. Diversi studi nel corso dell'ultimo paio di decenni hanno avuto come obiettivo primario la definizione del ruolo biologico di tale proteina che però non è stato ancora elucidato con precisione: come rappresentato in Figura 1, le funzioni attribuite a DJ-1 sono svariate e perlopiù di controllo omeostatico circa diverse funzionalità cellulari vitali.

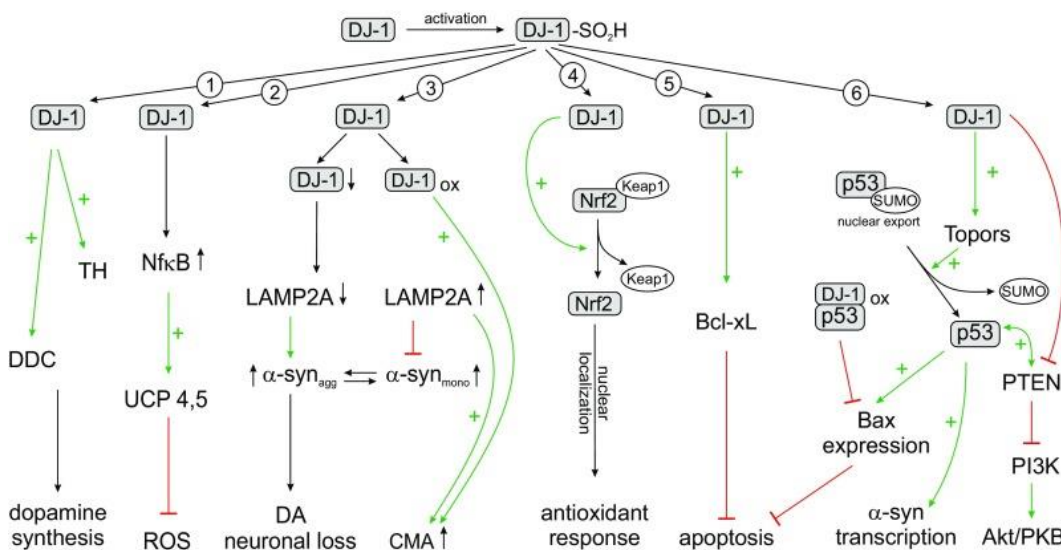


Figura 17: rappresentazione dettagliata della diversità degli effetti di DJ-1 nella cellula. 1. DJ-1 è stata descritta essere in grado di promuovere la sintesi di dopamina attraverso l'attivazione diretta degli enzimi tirosina-idrossilasi (TH) e 4-deidrossi-L-fenilalanina decarbossilasi (DDC). 2. Nel nucleo, DJ-1 sembra agire da co-attivatore trascrizionale di NF-κB che a sua volta promuove la trascrizione del gene codificante per UCP4, proteina di disaccoppiamento che può portare alla riduzione della produzione di ROS. 3. DJ-1 potrebbe prevenire la potenziale tossicità dell'aggregazione di α-sinucleina attraverso l'attivazione della degradazione di α-sinucleina per mezzo di autofagia mediata da chaperone. 4. DJ-1 sembra stimolare un sistema antiossidante endogeno attraverso l'attivazione di Nrf2. 5. DJ-1 sembra anche in grado di promuovere e stabilizzare Bcl-xL nei mitocondri al fine di prevenire l'apoptosi. 6. DJ-1 potrebbe infine regolare positivamente p53 attraverso sumoilazione mediata da TOPORS. La sovraespressione di DJ-1 diminuisce l'espressione di Bax e inibisce l'apoptosi. DJ-1, inoltre, inibisce PTEN per attivare il pathway P13K/PKB.

L'area di ricerca che ha suscitato maggiore interesse è rappresentata dal ruolo che DJ-1 svolge in condizioni di stress ossidativo nella cellula. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) provengono principalmente dal metabolismo energetico attraverso reazioni ossido-riduttive o eccitazione elettronica. La loro produzione è regolata da fattori di crescita e citochine, i quali intervengono all'interno di vie di segnalazione redox per

⁶ Smith N., 2017

⁷ Dolgacheva L. P., 2019

mantenerne le loro concentrazioni entro un range nanomolare. Ad esempio, il perossido di idrogeno rappresenta un importante fattore sensibile al metabolismo cellulare, e la sua omeostasi è regolata in risposta a diverse tipologie di stress o altre perturbazioni esterne. Ciononostante, un'incrementata produzione e un conseguente accumulo di ROS accompagnato da uno stato antiossidante alterato possono portare ad uno squilibrio dello stato di ossidazione fisiologica, definito per l'appunto stress ossidativo⁸.

L'attività antiossidante della proteina DJ-1 deriva dalla presenza di tre residui di cisteina (Cys43, Cys54, Cys106), i quali agiscono da sensori redox: i gruppi tiolo dei residui possono subire una progressiva ossidazione ad acido S-solfenico, S-sulfinico, e S-solfonico⁹. Il residuo C106 è quello più sensibile all'ossidazione da parte del perossido di ossigeno e il suo grado ossidativo sembra determinare il livello di DJ-1 attiva e l'attività stessa della proteina. Se il residuo C106 è presente nella sua forma solfonata, DJ-1 risulta inattivata: l'ossidazione eccessiva rende l'aminoacido fortemente acidofilo, compromettendo le sue funzionalità enzimatiche¹⁰.

Come suggerito da Björkblom e collaboratori¹¹, DJ-1 potrebbe svolgere un ruolo nelle dinamiche del traffico intracellulare neuronale, attraverso una ciclizzazione monomero-dimero modulata dal contesto ossidante. Lo stress ossidativo sarebbe in grado di potenziare la monomerizzazione della proteina DJ-1 wild-type citosolica, conducendo ad un reclutamento a livello nucleare. L'importazione di DJ-1 nella sua forma monomerica all'interno del nucleo neuronale potrebbe quindi avvenire secondo un meccanismo di trasporto mediato dallo stress ossidativo. Una volta localizzata nel nucleo, DJ-1 agirebbe da co-attivatore trascrizionale dei fattori di trascrizione NF- κ B, che a loro volta agiscono come inibitori dell'azione dei ROS¹².

Nonostante il processo non sia stato del tutto delucidato, anche la traslocazione mitocondriale di DJ-1 sembra essere favorita dal contesto ossidativo alterato e l'ossidazione di C106 appare essenziale per il suo trasporto¹³. Il reclutamento di DJ-1 a livello mitocondriale protegge la cellula dallo stress ossidativo¹⁴ e la proteina stessa

⁸ Dash B. P. et al., 2022

⁹ Dolgacheva L. P. et al., 2019

¹⁰ Song I. K. Et al., 2021

¹¹ Björkblom B. et al., 2014

¹² Kim et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012

¹³ Canet-Aviles RM et al., 2004

¹⁴ Junn E. et al., 2009

risulterebbe in grado di preservare l'attività del complesso I¹⁵. Di conseguenza, la sua funzione citoprotettiva risulta particolarmente rilevante all'interno di cellule cerebrali poiché la quantità di ROS prodotti da cellule ad elevata attività energetica è maggiore e di conseguenza necessitano di un adeguato sostegno da parte di molecole antiossidanti. Come indicato da Yokota e collaboratori¹⁶, l'assenza di DJ-1 provoca un incremento di morte cellulare causata da stress ossidativo, mentre la sovraespressione induce l'effetto contrario di citoprotezione. DJ-1 è stata suggerita essere in grado di neutralizzare tali specie reattive dell'ossigeno, agendo da *scavenger* nei loro confronti¹⁷.

Oltre alle funzioni appena descritte DJ-1 sembrerebbe svolgere un ruolo importante anche come chaperone molecolare, contribuendo al corretto ripiegamento delle proteine neosintetizzate nella loro forma tridimensionale fisiologicamente attiva e convogliando proteine danneggiate, laddove risultino irreparabili, verso il proteasoma. Anche in questo caso, la proteina è stata descritta attivarsi a livello citoplasmatico in un contesto ossidativo ed agire come chaperone molecolare sensibile allo stato redox della cellula¹⁸. In particolare, risulta interessante l'implicazione patologica che sottende tale funzionalità: l'inappropriato ripiegamento e la conseguente oligomerizzazione di α -sinucleina sono eventi che si manifestano sia nelle forme sporadiche che ereditarie della malattia di Parkinson e la proteina DJ-1 sembrerebbe essere coinvolta nell'inibizione iniziale degli aggregati monomerici della molecola, ma non della formazione di fibrille¹⁹. Nello specifico, la forma sulfenilica del residuo C106 risulterebbe particolarmente efficace nel contrastare la fibrillazione di α -sinucleina mentre forme maggiormente ossidate della proteina sono caratterizzate da modificazioni strutturali che impediscono il coinvolgimento nell'oligomerizzazione della molecola²⁰. Studi *in vitro* hanno confermato il ruolo di chaperone redox-sensibile di DJ-1 in quanto è stato osservato un decremento nei livelli di α -sinucleina²¹. Recentemente è stato scoperto che la proteina interagisce direttamente con monomeri e oligomeri di α -sinucleina non solo *in vitro* ma anche in

¹⁵ Hayashi T. et al., 2009

¹⁶ Yokota T. et al., 2003

¹⁷ Taira et al., 2004

¹⁸ Shendelman et al., 2004

¹⁹ Martinat et al., 2014

²⁰ Zhou et al., 2006

²¹ Xu et al., 2017

vivo e mutazioni nel gene park7 associate alla malattia di Parkinson possono limitare tale interazione²².

Un'ulteriore funzione ascrivibile alla proteina è relativa alla regolazione trascrizionale: DJ-1 potrebbe fungere da co-attivatore trascrizionale, legandosi non covalentemente a diverse proteine che includono fattori di trascrizione²³. Considerato che DJ-1 è stata descritta traslocare dal citoplasma al nucleo durante il ciclo cellulare in seguito a stimolazione da mitogeni, è possibile ipotizzare un ruolo della proteina nella crescita mediato dalla regolazione della trascrizione genica²⁴. DJ-1 risulta infatti in grado di regolare diversi geni funzionalmente rilevanti come, ad esempio, il gene tirosinidrossilasi (TH), responsabile della biosintesi della dopamina²⁵.

Le funzioni menzionate finora non risultano tuttavia esaustive per definire il ruolo biologico della proteina DJ-1 nel suo complesso. Una funzione poco studiata e che sembra emergere da dati recenti riguarda il ruolo che la proteina svolge all'interno delle dinamiche di comunicazione inter-organello e, più precisamente, tra mitocondri e lisosomi.

1.2 DJ-1: omeostasi autofagica e mitocondriale

Le disfunzioni mitocondriali presentano un ruolo centrale all'interno del quadro neurodegenerativo nella malattia di Parkinson. I mitocondri producono ROS anche in condizioni basali in quanto lavora attraverso la catena di trasporto di elettroni, la quale è esposta al rischio di dispersione elettronica. Tuttavia, la produzione di ROS può incrementare drasticamente in presenza di disfunzioni dei complessi mitocondriali poiché, in tali condizioni, viene indotto un flusso di elettroni inverso o un incremento della dispersione di elettroni, nel caso di iperpolarizzazione mitocondriale. L'incrementata produzione di ROS induce un danno ossidativo a diverse macromolecole quali DNA, proteine, lipidi, causando stress ossidativo. È noto ad oggi che lo stress

²² Zondler et al., 2014

²³ Takahashi-Niki K. Et al., 2017; Xu J. Et al., 2005; Ariga H. et al., 2017

²⁴ Kim S. J. Et al., 2012

²⁵ Zhong N. et al., 2006

ossidativo e le disfunzioni mitocondriali contribuiscono alla perdita di neuroni dopaminergici e alla progressione delle patologie neurodegenerative²⁶.

Come già menzionato, in condizioni di stress ossidativo DJ-1 trasloca ai mitocondri, sia nella matrice che nello spazio intermembrana, e tale importazione risulta associabile alla sua abilità di garantire neuroprotezione²⁷. È stato dimostrato che DJ-1 presenta una dislocazione a livello del complesso I mitocondriale anche in assenza di stress ossidativo ma che, in presenza di quest'ultimo, il legame della proteina alle subunità del complesso risulta più solido²⁸.

Esistono delle proteine, definite proteine disaccoppianti (UCPs), che promuovono la dispersione di elettroni per la generazione di calore al fine di placare la sovrapproduzione di ROS. Come indicato in Figura 1, DJ-1 sembrerebbe in grado di incrementare l'espressione di UCP4 attraverso una via di segnalazione che coinvolge il fattore NF-κB: la proteina sembrerebbe promuovere la traslocazione nucleare di NF-κB e, di conseguenza, la sopravvivenza della cellula²⁹. Di fatto, una delle proprietà funzionali di maggior rilevanza associabile a NF-κB è quella di protezione della cellula da apoptosi³⁰. Facendo riferimento alla morte cellulare per apoptosi, è importante menzionare anche l'esistenza dell'interazione tra DJ-1 e la molecola anti-apoptotica Bcl-xL³¹: quest'ultima, associandosi a formare eterodimeri con molecole pro-apoptotiche appartenenti alla famiglia di Bcl-2, previene il rilascio della molecola di citocromo c, che porterebbe all'attivazione della cascata caspatica, prodromica al processo apoptotico. In condizioni di stress ossidativo, Bcl-xL viene degradata da un sistema di ubiquitinazione (UPS) ma l'interazione con DJ-1 stabilizza i livelli della proteina, inibendo il suo processo degradativo³².

In seguito a danno mitocondriale, la cellula può inoltre programmare un meccanismo di degradazione mitocondriale specializzato definito mitofagia³³, che prevede lo smantellamento di mitocondri disfunzionali o irreparabilmente danneggiati al fine di

²⁶ Angelova et al., 2016; Balaban et al., 2005

²⁷ Canet-Aviles et al., 2004; Ashley et al., 2009; Junn et al., 2009

²⁸ Hayashi et al., 2009

²⁹ Xu et al., 2018

³⁰ Hoffman and Baltimore, 2006

³¹ Ren et al., 2011

³² Lee et al., 2018

³³ Youle and Narendra, 2011

circoscrivere il conseguente danno cellulare e promuovere un processo naturale di turnover mitocondriale. Una via di modulazione di tale meccanismo avviene attraverso le proteine PINK1³⁴ e parkin³⁵, e sembra coinvolgere anche la proteina DJ-1, che parrebbe supportare le funzioni mitocondriali durante eventi di stress ossidativo³⁶. DJ-1 risulta coinvolta dinamicamente nelle interazioni con PINK1 e parkin.

In questo contesto, DJ-1 sembrerebbe agire come un regolatore del bilancio energetico a cavallo tra le vie metaboliche mitocondriale e autofagica poiché la proteina è stata descritta partecipare contemporaneamente all'omeostasi del mitocondrio e alla modulazione dell'autofagia³⁷. A tal riguardo, studi recenti dimostrano come i mitocondri sembrano avere vie di comunicazioni informative sul loro stato bioenergetico che giungono ai lisosomi³⁸. Il cross-talk tra i due compartimenti cellulari può avvenire tramite contatti fisici diretti oppure attraverso specifiche vie di segnalazione³⁹. La mitofagia, processo autofagico specializzato alla degradazione mitocondriale, rappresenta la via di segnalazione a cui convergono i due organelli, mitocondri e lisosomi.

Dal momento che esistono diverse molecole che entrano in gioco all'interno del quadro di interazione tra lisosomi e mitocondri, queste ultime verranno prese in esame di seguito, con lo scopo di chiarire il contesto di comunicazione trasversale che intercorre tra di essi.

Il fattore di trascrizione EB (TFEB) rappresenta un mediatore della biogenesi lisosomiale⁴⁰ in grado di svolgere un ruolo fondamentale all'interno del quadro autofagico poiché, nel suo stato attivo defosforilato, è libero di migrare nel nucleo per modulare l'espressione di geni direttamente coinvolti nel processo dell'autofagia. La traslocazione di TFEB all'interno del nucleo è regolata da fosforilazione, vie di segnalazione che coinvolgono mTORC1 e ERK e defosforilazione calcineurina-dipendente⁴¹. mTORC1 è un complesso chinasi che regola negativamente l'autofagia e la biogenesi lisosomiale, inibendo TFEB, coinvolto invece ampiamente nella più

³⁴ Tang et al., 2006

³⁵ Moore et al., 2005

³⁶ Zhang et al., 2005

³⁷ De Lazzari F. et al., 2022

³⁸ Raimundo N. et al., 2016

³⁹ Raimundo, 2014

⁴⁰ Nezich et al., 2015

⁴¹ Medina et al., 2015

importante via di clearance cellulare⁴². Infatti, il complesso proteico mTORC1 agisce da modulatore nei confronti di TFEB, fosforilandolo e inducendolo al legame con proteine chaperone 14-3-3 che lo trattengono nella sua forma inattiva all'interno del citoplasma.

In un contesto sperimentale di incrementata mitofagia, TFEB è stata descritta traslocare nel nucleo per svolgere la sua funzione trascrizionale con la partecipazione di altre proteine, quali PINK1 e parkin⁴³. L'attivazione di TFEB, quindi, può essere dovuta a malfunzionamento mitocondriale oltre che al digiuno, corroborando l'ipotesi secondo cui i due organelli presentano di fatto molteplici modalità di interazione. Laddove si registrano sperimentalmente elevati livelli di TFEB con localizzazione nucleare, si annotano di conseguenza un'incrementata biogenesi lisosomiale osservabile in termini di aumentate concentrazioni di enzimi lisosomiali ma anche una biogenesi mitocondriale compensatoria, possibilmente attivata da TFEB stesso⁴⁴.

Un'altra proteina che ricopre particolare ruolo all'interno di questa via di informazione è AMPK (5' AMP-activated protein kinase), anch'essa coinvolta nella correlazione tra difetti mitofagici e alterazioni del processo autofagico. AMPK riveste un ruolo di sensore dello stress energetico intracellulare e risulta espressa ubiquitariamente. L'attività di AMPK risulta modulata da fattori quali livelli di ROS o rapporto delle concentrazioni di ATP/ADP. Nella sua forma attiva, AMPK promuove la traslocazione nucleare di TFEB e l'attivazione trascrizionale dell'autofagia, inibendo la via di segnalazione mTOR⁴⁵. L'attivazione di AMPK avviene in condizioni di acuto stress mitocondriale mentre essa risulta repressa se i mitocondri sono stati irreparabilmente compromessi, comprovando l'ipotesi secondo la quale AMPK sia cruciale per il cross-talk tra i due compartimenti cellulari⁴⁶.

L'enzima idrolitico lisosomiale β -glucocerebrosidasi (GBA), codificato dal gene house-keeping GBA1, idrolizza molecole di glucocerebrosidi a glucosio e ceramide e rappresenta un ulteriore possibile meccanismo molecolare di comunicazione mitocondri-lisosomi. Le disfunzioni relative a GBA portano in generale ad autofagia basale alterata e ad un malfunzionamento del processo di degradazione lisosomiale; mutazioni

⁴² Medina et al., 2016

⁴³ Nezhich et al., 2015

⁴⁴ Ivankovic et al., 2015

⁴⁵ Ha J. Et al., 2015

⁴⁶ Fernandez-Mosquera L. et al., 2019

eterozigoti al gene GBA1 sono spesso associate a difetti nel processo autofagico specifico della mitofagia e a disfunzioni mitocondriali, correlando di conseguenza i due compartimenti⁴⁷. È stato dimostrato che l'assenza di GBA in organismi modello provoca la manifestazione di sintomi di tipo parkinsoniano a livello fenotipico. Si riscontra inoltre un decremento del processo di turnover delle molecole di α -sinucleina, che vanno incontro ad oligomerizzazione, portando alla conseguente formazione di corpi di Lewy. In assenza di GBA, sono state osservate anche alterazioni strutturali dei mitocondri, che risultano frammentati e presentano difetti relativi alla catena respiratoria⁴⁸.

Un ulteriore pathway rilevante all'interno del quadro d'interazione tra mitocondrio e lisosoma coinvolge in particolare le specie reattive dell'ossigeno e lo ione calcio: in un contesto in cui la concentrazione di ROS aumenta, la loro diffusione può provocare l'attivazione di uno specifico canale di esportazione di Ca^{2+} lisosomiale. Di conseguenza si ha un incremento dei livelli di calcio esportati al citoplasma, che portano all'attivazione dell'enzima fosfatasi calcineurina, il quale è in grado di defosforilare TFEB attivandolo⁴⁹. Attraverso i meccanismi menzionati precedentemente, TFEB promuoverà l'attività mitofagica della cellula.

È possibile comprendere il ruolo che DJ-1 svolge all'interno delle dinamiche appena descritte studiando gli effetti indotti dalla sua assenza. A tal riguardo è stato dimostrato che l'assenza di DJ-1 determina una compromissione dell'attivazione del flusso autofagico ma, tuttavia, le vie molecolari attraverso cui questo avviene non sono del tutto chiarite⁵⁰. Sono stati di fatto riscontrati molteplici effetti della perdita di funzione della proteina sul bersaglio cruciale della via di segnalazione mTOR, ossia TFEB⁵¹. In questo contesto, risulta interessante esaminare le varie tipologie di meccanismi coinvolti al fine di comprendere più chiaramente come risultino compromesse le diverse funzionalità al mancare della proteina DJ-1.

⁴⁷ Li H. et al, 2019

⁴⁸ Osellame et al., 2013

⁴⁹ Zhang et al., 2016

⁵⁰ Qin X. et al, 2019

⁵¹ Xue R. et al., 2017

1.3 Drosophila melanogaster come organismo modello

Drosophila melanogaster, comunemente conosciuta come il moscerino della frutta, rappresenta ormai da decenni un organismo interessante dal punto di vista genetico, poiché a circa il 70% dei geni coinvolti in malattie umane corrisponde un proprio omologo all'interno del DNA di *Drosophila*⁵². Essa rappresenta per questo motivo un efficace modello per lo studio relativo alle malattie neurodegenerative, fornendo una panoramica valida nel contesto di meccanismi patologici e sviluppo di terapie rivolte alla cura di tali disturbi.

Relativamente alla malattia di Parkinson familiare legata a DJ-1, *Drosophila* presenta due differenti geni ortologhi: *dj-1 α* , espresso prevalentemente a livello testicolare e *dj-1 β* , espresso ubiquitariamente. Mutazioni a livello di *dj-1 β* causano una sindrome simil-Parkinsoniana nei moscerini, caratterizzata da un puntuale calo della capacità motoria e da un'aumentata sensibilità allo stress ossidativo in termini generali⁵³, anche se non si osserva la perdita progressiva dei neuroni dopaminergici che caratterizza la malattia⁵⁴. I moscerini mutanti per il gene *dj-1 β* esibiscono fenotipi associabili, dunque, al disturbo neurodegenerativo di Parkinson ossia difetti motori, ipersensibilità a insulti da stress ossidativo ed un incremento dei livelli di ROS⁵⁵.

Nel paragrafo successivo, verranno presi in considerazione più nello specifico i fenotipi osservabili nei modelli di *Drosophila* knock-out per il gene *dj-1 β* e le diverse modalità attraverso cui essi siano trasponibili sulla ricerca volta all'individuazione di target terapeutici nel contesto di disturbi neurodegenerativi.

1.4 Conseguenze della perdita di funzione di DJ-1

Diversi studi nel corso degli ultimi decenni hanno suggerito una possibile correlazione tra la sintomatologia legata alla malattia di Parkinson e disturbi di natura metabolica. Ad esempio, il metabolismo glucidico sembrerebbe essere regolato in funzione dell'alterata attività mitocondriale⁵⁶ e tale regolazione potrebbe contrastare l'insufficienza energetica e la morte cellulare che si verificherebbero in seguito a compromissione della funzionalità

⁵² Bilen J. et al., 2005

⁵³ Stefanatos R. et al., 2012

⁵⁴ Moore D. et al., 2006

⁵⁵ Lavara-Culebras E. et al., 2007; Lavara-Culebras E. et al, 2010; Casani S. et al., 2013

⁵⁶ Anandhan A. et al., 2017

del mitocondrio⁵⁷. Si è ipotizzato di conseguenza che l'incrementata produzione di ROS che consegue alla mancanza di DJ-1 all'interno della cellula possa portare al passaggio del metabolismo energetico ad una glicolisi anaerobia come risposta adattativa per ridurre i livelli di specie reattive⁵⁸.

Come descritto nel paragrafo successivo, studi effettuati utilizzando diversi organismi modello, e *Drosophila melanogaster* in particolare, sono risultati di grande utilità permettendo di approfondire il legame tra la malattia di Parkinson ed alterazioni metaboliche.

1.4.1 Aspetti metabolici

In organismi DJ-1 KO, partendo dall'analisi dei livelli di alcuni enzimi glicolitici, si è potuto dimostrare la presenza di alterazioni del pathway glicolitico⁵⁹. A dimostrazione di ciò, in *Drosophila* si è osservato un consumo incrementato di glucosio per sopperire alle richieste energetiche della cellula e ripristinare i livelli di ATP attraverso una via metabolica più lunga e meno efficiente rispetto alla catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri⁶⁰.

Recentemente, attraverso analisi metabolomiche eseguite su organismi mutanti di *Drosophila* KO per *dj-1 β* , è stato possibile ricavare un quadro generale sulle alterazioni indotte dall'assenza della proteina nel metabolismo energetico. Più precisamente, attraverso un'analisi condotta mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, sono state riscontrate diverse alterazioni a livello di metabolismo amminoacidico, il passaggio dal ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) al ciclo glicolitico, oltre a perturbazioni che interessano altri pathway metabolici come il ciclo dell'urea⁶¹. Nello specifico, le vie metaboliche relative agli amminoacidi ramificati, quali valina, leucina ed isoleucina, oltre ad altri amminoacidi essenziali, sono risultate perturbate nei moscerini KO per *dj-1 β* . I conseguenti livelli ridotti, riscontrati anche in campioni umani, sembrerebbero esacerbare i sintomi e la severità clinica nei pazienti affetti da malattia di Parkinson⁶². Gli amminoacidi ricoprono infatti un ruolo importante nel cervello

⁵⁷ Requejo-Aguilar R. et al., 2016

⁵⁸ Cai R. et al., 2019

⁵⁹ Solana-Manrique C. et al., 2020

⁶⁰ Solana-Manrique C. et al., 2022

⁶¹ Solana-Manrique C. et al., 2022

⁶² Tosukhowong P. et al., 2016

considerando anche che alcuni di essi possono essere metabolizzati per rifornire energeticamente la cellula laddove quest'ultima presenti un'insufficienza energetica⁶³. A tal riguardo, nei mutanti *dj-1 β* è stato osservato un incremento nel catabolismo amminoacidico, attraverso la trasformazione dei residui in acetyl-CoA o altri intermedi del ciclo TCA al fine di produrre energia⁶⁴, compensando il deficit di ATP dovuto al malfunzionamento mitocondriale. La riduzione nei livelli di aminoacidi osservata è risultata inoltre in linea con il malfunzionamento dei meccanismi di sintesi proteica nei muscoli, fattore che inasprisce la sintomatologia motoria dei pazienti di Parkinson⁶⁵.

1.4.2 Aspetti mitocondriali e lisosomiali

Mutazioni relative al gene di DJ-1 e la sua perdita di funzione all'interno di una cellula sono fortemente associate a disfunzioni mitocondriali, frammentazione mitocondriale e un forte declino della funzionalità del mitocondrio. In *Drosophila*, sia in condizioni basali che in presenza di stress ossidativo, i mutanti KO per *dj-1 β* presentano modificazioni ultrastrutturali a livello mitocondriale così come attività compromessa del complesso I della catena di trasporto degli elettroni. I mutanti, inoltre, sono caratterizzati da un'incrementata sensibilità al digiuno.

Come riportato in precedenza, difetti legati all'enzima idrolitico lisosomiale GBA risultano di fatto associati alla patologia di Parkinson e mutazioni eterozigoti per GBA1 rappresentano uno dei maggiori fattori di rischio che ne provocano la sua manifestazione. Analizzando la linea cellulare SH-SY5Y knock-down per *DJ-1* e organismi mutanti knock-out per *dj-1 β* è stato possibile ottenere, nel laboratorio dove ho svolto l'internato, risultati preliminari che indicano una ridotta attività di GBA e che supportano alterazioni nell'attività lisosomiale. L'effetto risulta particolarmente legato alla perdita di funzione di DJ-1 poiché in cellule i cui livelli della proteina risultano sovra-espressi, i valori di GBA risultano conseguentemente incrementati rispetto ai modelli di controllo. Analizzando la linea cellulare SH-SY5Y knock-down per *DJ-1* è stato riscontrato inoltre che i livelli di proteine annesse alle attività autofagica e lisosomiale (come TFEB) e quelli di substrati autofagici risultano fortemente diminuiti in comparazione ai valori rilevati negli organismi di controllo. A maggiore dimostrazione di quanto appena esposto, in

⁶³ Garabadu D. et al., 2019

⁶⁴ Shao Y. et al., 2019

⁶⁵ Neinast M. et al., 2019

organismi KO per *dj-1 β* sono stati rilevati maggiori quantità di autofagosomi e una riduzione del tasso di fusione di autofagosomi e lisosomi in riferimento ai dati ottenuti per i controlli, comprovando la capacità di DJ-1 di alterare il processo autofagico.

Infine, è stato anche osservato un decremento nei livelli di AMPK nella sua forma fosforilata (p-AMPK) nei mutanti *dj-1 β* : tale effetto è imputabile alla perdita di funzione di DJ-1 poiché il fenotipo risulta inverso in moscerini che sovra-esprimono la suddetta proteina, con livelli di p-AMPK superiori rispetto ai controlli. Sapendo che l'attività di AMPK pregiudica la funzionalità di mTOR, è stato preso in esame il grado di fosforilazione del substrato di mTOR, S6K (p-S6K), i cui livelli risultano incrementati in genotipi KO per *dj-1 β* e aumentati se la proteina *dj-1 β* è invece sovra-espressa. Controlli generali per il recupero della funzionalità sono stati eseguiti all'interno dello studio, giungendo alla conclusione che AMPK svolge una parte fondamentale all'interno del quadro compromesso dall'assenza di DJ-1⁶⁶.

Ciò ha dimostrato dunque il coinvolgimento della proteina DJ-1 sia a livello autofagico che lisosomiale, corroborando l'ipotesi che essa svolga un ruolo non indifferente all'interno di dinamiche cellulari quali il controllo del flusso autofagico e della degradazione lisosomiale.

⁶⁶ De Lazzari F. et al., 2023

2. SCOPO DELLO STUDIO

Da quanto detto finora, appare chiaro che l'assenza della proteina DJ-1 possa influire sull'attività dei lisosomi e sul processo autofagico, anche se i meccanismi non sono stati ancora elucidati. Come illustrato in precedenza, un'ipotesi è che DJ-1 possa influenzare l'autofagia attraverso il suo contributo alle funzioni mitocondriali. Un altro meccanismo potrebbe essere invece correlato all'attività della proteina nel modulare il metabolismo energetico associato agli aminoacidi.

Un tipo di stress cellulare come quello causato dal digiuno rappresenta un forte stimolo per promuovere l'autofagia. Di conseguenza, una minor capacità di resistere a tale stress può essere associata ad una compromissione dei processi fisiologici che sottendono l'autofagia.

In laboratorio, è stato dimostrato che moscerini privi di *dj-1 β* presentano una resistenza diversa allo stimolo del digiuno, morendo prima rispetto ad organismi wild-type. Come menzionato in precedenza, concentrazioni differenziate relativamente a diversi aminoacidi sono state osservate nei mutanti *dj-1 β* relativamente ad individui wild-type, suggerendo che livelli di aminoacidi diversi possano essere direttamente responsabili di una risposta altrettanto diversificata nella funzione autofagica e di conseguenza nella resistenza al digiuno. Sulla base di tale studio, nel nostro laboratorio abbiamo deciso di allestire una ricerca che ponesse come fulcro la composizione in micronutrienti della pappa alimentare di organismi di *Drosophila* al fine di comprendere se le differenze nelle resistenze al digiuno di moscerini di diverso genotipo variassero o meno a seconda della tipologia di nutrimento di crescita assunto.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi di *Drosophila melanogaster* e mantenimento dei moscerini

Per portare avanti l'indagine, sono stati utilizzati ceppi dell'organismo di tipo *Drosophila* w1118 (BDSC_5905), dj-1 β Δ 93 (BDSC_33601) ottenuti dallo Stock Centre di *Drosophila* di Bloomington. Tutti i ceppi sono stati fatti crescere all'interno di tubi mantenuti ad una temperatura controllata di 25°C, a cicli alterni di 12 ore di esposizione a luce e buio. I moscerini adulti vengono fatti accoppiare in tubi che contengono determinate miscele di nutrienti per la crescita che risulteranno poi determinanti per l'analisi dei dati finali. Individui maschi di 1-3 giorni vengono poi prelevati e separati dalle femmine grazie all'impiego di una breve esposizione a CO₂ e riposti in tubi contenenti acqua e agar all'1.5% per essere sottoposti al periodo di digiuno totale.

3.2 Tipologie di pappe di crescita

Di seguito, in tabella, sono riportati i dati che riportano gli ingredienti e le composizioni della miscela base e delle pappe alternative utilizzate per la crescita dei moscerini.

	PAPPA DI CRESCITA STANDARD	PAPPA SENZA AMINOACIDI	PAPPA SENZA ZUCCHERI
MELASSA	44 g	0 g	44 g
ESTRATTO DI MALTO	160 g	160 g	160 g
AGAR	16 g	16 g	16 g
LIEVITO	36 g	36 g	0 g
FARINA DI MAIS	140 g (senza glutine)	140 g (senza glutine)	140 g (senza glutine)
FARINA DI SOIA	20 g	20 g	0 g
ACQUA	2 l	2 l	2 l
NIPAGIN	28 ml	28 ml	28 ml
ACIDO PROPIONICO	12.4 ml	12.4 ml	12.4 ml

La miscela base è stata modificata in base alle esigenze del nostro studio: per la pappa senza zuccheri, è stata omessa la melassa mentre per la pappa priva di aminoacidi, non sono stati aggiunti né lievito né farina di soia. Come rammentato precedentemente, all'interno delle due tipologie di pappe sono stati allevati separatamente ma in parallelo moscerini maschi wild-type e *DJ-1* KO, affinché si potessero ottenere informazioni sul ruolo della composizione dei nutrienti durante il periodo di digiuno.

3.3 Analisi dei dati

I moscerini sono stati riposti all'interno dei tubi in quantità variabili di circa 20 individui ciascuno e, durante il periodo di digiuno, il tasso di decesso è stato registrato e riportato all'interno di grafici realizzati con il software “GraphPad Prism 8”.

4. RISULTATI

Le pappe particolari in cui i moscerini sono stati fatti nascere sono rappresentate dalla miscela priva di aminoacidi e da quella mancante di zuccheri: di seguito, sono riportati i grafici che descrivono il tasso di sopravvivenza in funzione del tempo dei due diversi genotipi nei diversi contesti di crescita, ossia in pappa integrale completa di tutti i nutrienti (Figura 2), in pappa senza zuccheri (Figura 3) ed in pappa priva di aminoacidi (Figura 4).

Nel grafico riportato in Figura 2, si osservano le differenze riscontrabili nel tasso di decessi di moscerini wild-type rispetto ai mutanti *dj-1 β* : sebbene la differenza non risulti particolarmente accentuata, i moscerini wild-type presentano una maggiore capacità di sopravvivenza e rimangono in vita più a lungo rispetto a quelli di fenotipo mutante.

Prendendo in esame la Figura 3 è possibile osservare che, a prescindere del genotipo, le miscele private di carboidrati come base alimentare portano ad una minore resistenza allo stress del digiuno e i moscerini tendono tutti a perire a meno di 40 ore dall'inizio del periodo di privazione alimentare. Le differenze tra i due genotipi, in questo caso, tendono ad annullarsi e non risultano significative.

Ponendo infine l'attenzione sul grafico di Figura 4, appare chiaro come le differenze tra i due genotipi non solo permangono ma risultano persino accentuate: gli organismi knock-out per *dj-1 β* periscono tutti prima delle 50 ore dall'inizio del periodo di digiuno mentre alcuni dei moscerini wild-type non presentano difficoltà di sopravvivenza sino a circa 60 ore dall'inizio del trattamento. Confrontando il grafico in questione con quello riportante la resistenza al digiuno di individui nati in pappe complete, appare chiaro come la capacità generale di sopravvivenza dei moscerini di entrambi i genotipi risulti persino aumentata per i moscerini cresciuti in pappa priva di aminoacidi, aspetto interessante che sarebbe opportuno approfondire.

In conclusione, risulta evidente che il ruolo svolto dagli aminoacidi nel contesto studiato sia di grande rilevanza: gli aminoacidi potrebbero essere dunque implicati nella differenza tra i diversi gradi di resistenza al digiuno che discriminano i due genotipi.

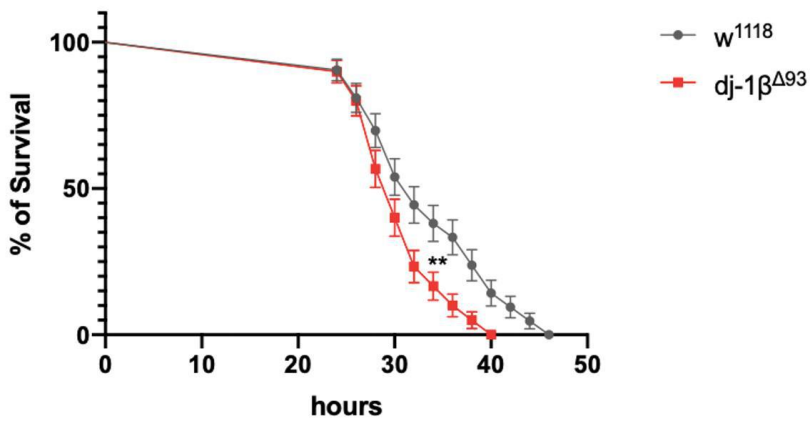


Figura 2: nel grafico è riportato il tasso di decesso dei moscerini di entrambi i genotipi (*dj-1β* e wild-type) cresciuti in pappa completa di tutti i nutrienti e sottoposti ad una condizione di digiuno.

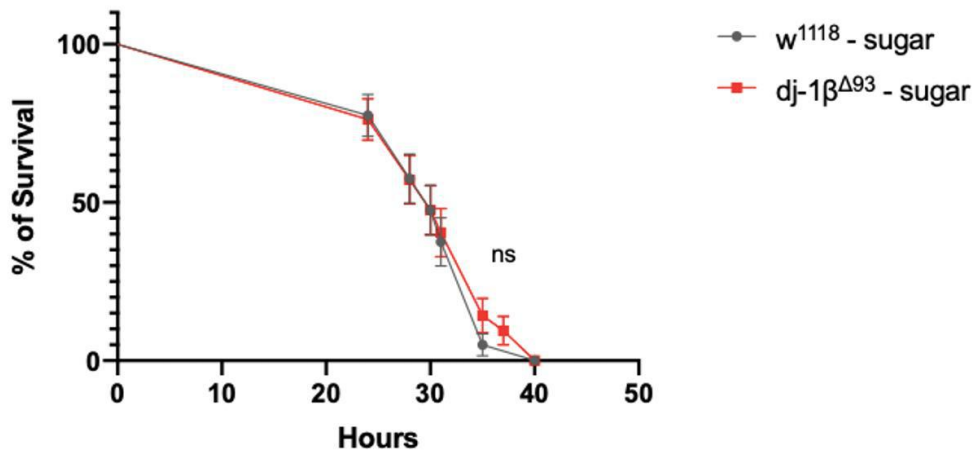


Figura 3: nel grafico è riportato il tasso di decesso dei moscerini di entrambi i genotipi (*dj-1β* e wild-type) cresciuti in pappa priva di zuccheri e sottoposti ad una condizione di digiuno.

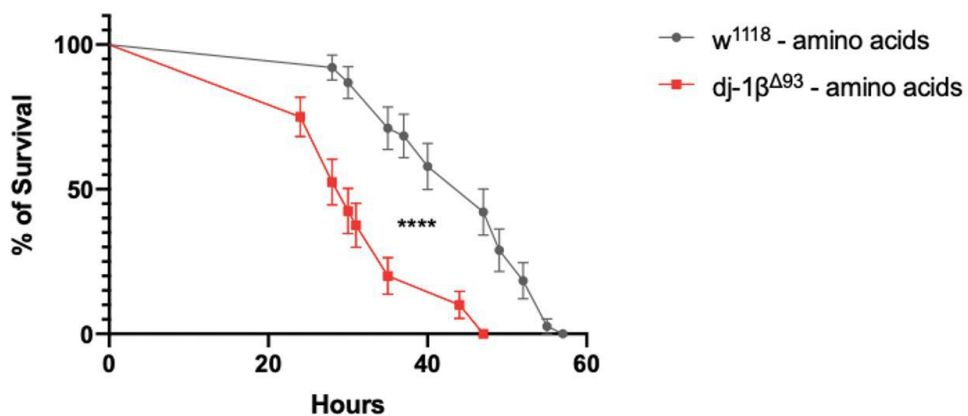


Figura 4: nel grafico è riportato il tasso di decesso dei moscerini di entrambi i genotipi (*dj-1β* e wild-type) cresciuti in pappa privata da aminoacidi e sottoposti ad una condizione di digiuno.

5. DISCUSSIONE

Esistono diversi approcci attraverso cui è possibile interpretare i dati ottenuti nello studio portato avanti presso il nostro laboratorio: l'interpretazione dei risultati non è semplice ma ciò non impedisce di formulare alcune ipotesi.

In generale, dai dati ottenuti emerge chiaramente che la proteina DJ-1 è coinvolta nel processo autofagico e permette ai controlli di sopravvivere più a lungo ove sottoposti ad uno stress da privazione di nutrienti, quale il digiuno. L'autofagia nei controlli potrebbe manifestarsi in uno stato potenziato rispetto a quello dei moscerini KO per *dj-1 β* , permettendo ai primi di recuperare più nutrienti in maniera più efficace e mantenendo un tasso di degradazione di materiale di recupero più efficiente. La presenza di DJ-1 potrebbe svolgere un ruolo nell'utilizzo di aminoacidi nei processi energetici durante le condizioni basali dell'organismo, permettendone un utilizzo frazionato e controllato nel momento in cui si manifestano eventi perturbanti quali il digiuno. Ciò potrebbe essere alla base degli scompensi metabolici e alterazioni fisiologiche che insorgono laddove DJ-1 è assente e non può rivestire le proprie funzioni: si ha di conseguenza la mancata possibilità di un controllo sul corretto flusso autofagico.

Poiché in moscerini nati in presenza di soli aminoacidi il tasso di mortalità osservato è pressoché comparabile nei due genotipi, è importante focalizzare la ricerca e gli studi a venire sulle modalità attraverso cui DJ-1 possa essere implicato nel mantenimento o preservazione degli aminoacidi stessi dell'organismo durante il periodo di digiuno: altre sperimentazioni potrebbero basarsi sulla crescita di *Drosophila* in pappe contenenti aminoacidi specifici per discriminare quale o quali molecole potrebbero rappresentare potenziali target terapeutici su cui indagare nell'ambito della neuro-degenerazione. Come già menzionato, l'autofagia è un processo fondamentale che permette alla cellula di mantenere una propria omeostasi e di rimuovere componenti cellulari danneggiate o malfunzionanti, promuovendo il mantenimento corretto della funzionalità dei diversi organelli ed eliminando materiali potenzialmente dannosi. L'attivazione del processo autofagico risulta particolarmente critica per cellule come i neuroni e la sua modulazione potrebbe rappresentare un target terapeutico promettente per contrastare la progressione delle malattie neurodegenerative e rallentare il tasso di morte neuronale. Il coinvolgimento della proteina DJ-1 risulterebbe critico nell'indagine e avvalorandosi dei

risultati già ottenuti dagli studi negli ultimi decenni, continuerà a rappresentare un'ottima base per l'allestimento di esperimenti, data anche la disponibilità di organismi mutanti e modelli specifici per le diverse malattie neurodegenerative.

La polifunzionalità della proteina in questione rende di difficile interpretazione il suo ruolo definito ma, sebbene questo aspetto da un lato possa rappresentare un ostacolo per la ricerca, dall'altro, le vie di indagine risultano molteplici e potenzialmente anche le strategie terapeutiche innovative nel contesto dei disturbi neurodegenerative.

6. BIBLIOGRAFIA

- 9 Ariga, H., Takahashi-Niki, K., *Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease* in "Oxid. Med. Cell. Longev." (a. 2013, n. 2013), 683920.
- 9 Aryal B., Lee Y., *Disease model organism for Parkinson disease: Drosophila melanogaster*, in "BMB Rep." (a. 2019, n. 52(4)), p. 250-258, DOI: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.4.204>
- 9 Biplab K. D., Kumar D., Yasuomi U., *Redox-sensitive DJ-1 protein: an insight into physiological roles, secretion, and therapeutic target*, in "Redox Experimental Medicine", (a. 2022, n. 1), R96-R115, DOI: <https://doi.org/10.1530/REM-22-0007>
- 9 Björkblom, Benny & Maple-Grødem, Jodi & Puno, Marc Rhyan & Odell, Mark & Larsen, Jan & Moller, Simon. (2014). Reactive Oxygen Species-Mediated DJ-1 Monomerization Modulates Intracellular Trafficking Involving Karyopherin β 2. *Molecular and cellular biology*. 34. 3024-3040. 10.1128/MCB.00286-14.
- 9 De Lazzari F., Agostini F., Plotegher N., *DJ-1 promotes energy balance by regulating both mitochondrial and autophagic homeostasis*, in "Neurobiology of Disease 176" (2023)
- 9 Dolgacheva L. P., Berezhnov A. V., *Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease*, in "J Bioenerg Biomembr." (Giugno 2019, n. 51(3)), p. 175-188, DOI: 10.1007/s10863-019-09798-4
- 9 Fernandez-Mosquera L., Yambire K., Couto R., *Mitochondrial respiratory chain deficiency inhibits lysosomal hydrolysis*, in "Autophagy" (Settembre 2019, n. 19), p. 1572-1591, DOI: 10.1080/15548627.2019.1586256
- 9 Ha J, Guan K., Kim J., *AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism*, in "Mol Aspects Med." (Dicembre 2015, n. 46), p. 46-62, DOI: 10.1016/j.mam.2015.08.002
- 9 Jaramillo-Gomez J., Nino A., Arboleada H., *Overexpression of DJ-1 protects against C2-ceramide-induced neuronal death through activation of the PI3K/AKT pathway and inhibition of autophagy*, in "Neuroscience Letters" (31 Agosto 2015, volume n. 603), p. 71-76, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.07.032>

- 9 Medina D., Di Paola S., *Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB*, in “Nat Cell Biol.” (Marzo 2015, n. 3), p. 288-299, DOI: 10.1038/ncb3114
- 9 “MedlinePlus, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US)”, aggiornato 1 Maggio 2012, <https://medlineplus.gov/genetics/gene/park7/#conditions>
- 9 Meulener M., Xu K., *Mutational analysis of DJ-1 in Drosophila implicates functional inactivation by oxidative damage and aging*, in “Proc Natl Acad Sci U S A.” (15 Agosto 2006, n. 103 (33)), p. 12517-12522, DOI: 10.1073/pnas.0601891103
- 9 Moore D., Dawson V., *Lessons from Drosophila Models of DJ-1 Deficiency*, in “Science of Aging Knowledge Environment” (11 Gennaio 2006, n. 2), DOI: 10.1126/sageke.2006.2.pe2
- 9 Qin X., Lu A., *DJ-1 inhibits autophagy activity of prostate cancer cells by repressing JNK-Bcl2-Beclin1 signaling*, in “Cell Biol Int.” (Aprile 2020, n.4), p. 937-946, DOI: 10.1002/cbin.11290
- 9 Smith N, Wilson MA. Structural Biology of the DJ-1 Superfamily. Adv Exp Med Biol. 2017;1037:5-24. doi: 10.1007/978-981-10-6583-5_2. PMID: 29147900.
- 9 Solana-Marique C., José Sanz F., Ripollés E., *Enhanced activity of glycolytic enzymes in Drosophila and human cell models of Parkinson's disease based on DJ-1 deficiency* in “Free Radical Biology and Medicine”, (ottobre 2020, volume n. 158), p. 137-148
- 9 Solana-Manrique C., José Sanz F., Torregrosa I., *Metabolic Alterations in a Drosophila Model of Parkinson's Disease Based on DJ-1 Deficiency*, in “Cells” (2022), pubblicato 20 gennaio 2022
- 9 Stefanatos R., Sriram A, *dj-1 β regulates oxidative stress, insulin-like signaling and development in Drosophila melanogaster*, in “Cell Cycle” (15 Ottobre 2012, n. 11(20)), p. 3876-3886, DOI: 10.4161/cc.22073
- 9 Subramaniam S. R., Chesselet M., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease*, in “Prog Neurobiol.” (a. 2012 Luglio-Agosto, n. 0), 17-32, pubblicato 30 aprile 2020, DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.004

- 9 Sun, M.E.; Zheng, Q. The Tale of DJ-1 (PARK7): A Swiss Army Knife in Biomedical and Psychological Research. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 7409. <https://doi.org/10.3390/ijms24087409>
- 9 Uma A. M., Sang-Bing O., Derek J. H., *Parkinson's disease proteins: Novel mitochondrial targets for cardioprotection*, in “Pharmacology and Therapeutics” (a. 2015, Dicembre, n. 156), 34-43, DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.10.005
- 9 Xue R., Jiang J., *DJ-1 activates autophagy in the repression of cardiac hypertrophy*, in “Arch Biochem Biophys.” (1 Novembre 2017, n. 633), p. 124-132, DOI: 10.1016/j.abb.2017.09.012
- 9 Yanjun L., Yingyu C., *AMPK and Autophagy*, in “Autophagy: Biology and Disease” (28 Novembre 2019), p. 85-108