

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia

Elaborato di laurea

Il ruolo di USP14 nella regolazione della traslocazione di TFEB al nucleo

Tutor: Prof.ssa Elena Ziviani, Dipartimento di Biologia

Cotutor: Dott.ssa Elena Marchesan, Dipartimento di Biologia

Laureanda:

Sara Fabris

Matricola: 1201939

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

INTRODUZIONE	5
1.1. Il sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)	5
1.2. La deubiquitinasi USP14	7
1.3. Autofagia: un meccanismo per il controllo della qualità cellulare	8
1.4. L'asse TFEB-Calcineurina regola l'autofagia	9
SCOPO DELLO STUDIO	10
MATERIALI E METODI	11
3.1. Colture cellulari	11
3.1.1 Fibroblasti embrionali di topo (MEFs)	11
3.1.2 Cellule di rene embrionale umano (HEK293)	11
3.1.3 Semina e trasfezione delle cellule	12
3.2. Estrazione del DNA	13
3.2.1 PCR	13
3.3. Frazionamento nucleare	14
3.4. Western blot	14
3.5. Imaging.....	15
3.5.1 Imaging confocale.....	15
3.5.2 Analisi delle immagini con ImageJ	15
RISULTATI	17
4.1. L'espressione di USP14 regola i livelli della fosfatasi calcineurina...17	
4.2. Analisi della traslocazione nucleare di TFEB nelle HEK293	19
4.3. Analisi della traslocazione nucleare di TFEB in MEFs	21
DISCUSSIONE	23
BIBLIOGRAFIA	26
RINGRAZIAMENTI	28

1. INTRODUZIONE

Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e l'autofagia sono i principali meccanismi adibiti al controllo qualità e riciclaggio delle componenti intracellulari, regolando quindi l'omeostasi cellulare negli Eucarioti. In entrambi i processi l'ubiquitina, una piccola proteina regolatoria, funge da etichetta molecolare delle proteine target: l'aggiunta reversibile di uno o più monomeri di ubiquitina può modificare il destino o funzione delle proteine, impattando ad esempio sulla loro localizzazione molecolare o interazione con altre molecole (Kocaturk N.M. et al., 2018). In particolare, l'ubiquitinazione viene impiegata sia dall'UPS che dal macchinario autofagico come segnale di degradazione, seppur con meccanismi diversi. L'UPS si occupa della degradazione delle proteine di breve durata (short-lived proteins) danneggiate o mal ripiegate, mentre l'autofagia elimina le proteine di lunga durata (long-lived proteins), organelli disfunzionali e parassiti intracellulari, per esempio i batteri.

1.1 Il sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)

Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) è il principale complesso proteolitico deputato alla degradazione delle proteine cellulari mal ripiegate e danneggiate. L'UPS inoltre regola una serie di importanti processi biologici come la proliferazione cellulare, l'apoptosi, la trasduzione del segnale e l'immunità (Chen J. et al., 2020).

Il proteasoma 26S è la principale proteasi a multisubunità presente nelle cellule eucariotiche; esso è composto da due sotto complessi: la componente regolatoria 19S (RP) e il core 20S (CP). I siti attivi proteolitici del proteasoma risiedono all'interno della particella centrale 20S e sono accessibili solo attraverso dei pori assiali gated. Il gating di questi pori è controllato dalla subunità regolatoria 19S, che ricopre una o entrambe le estremità del core centrale. La subunità 19S riconosce i substrati tramite un insieme diversificato di recettori dell'ubiquitina e media la traslocazione dei substrati nella camera di degradazione del nucleo proteolitico, dove vengono idrolizzati. La traslocazione richiede l'idrolisi dell'ATP, che viene effettuata da un anello eteroesamerico di ATPasi, localizzate nell'RP. Il core 20S comprende quattro anelli eteroheptamerici assemblati con una architettura di tipo $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$, dove gli anelli esterni sono formati dalle subunità α e quelli interni dalle subunità β . Le subunità proteoliticamente attive sono β_5 , β_2 , β_1 . L'RP è costituito da 19 proteine e suddiviso in due sotto complessi, la "base" e il "coperchio". La base è costituita da sei subunità ATPasi (Rpts) di particelle regolatorie AAA e da quattro subunità non ATPasi di particelle regolatorie (Rpns), tra cui Rpn13, un recettore del substrato che può agganciare

l'ubiquitina al proteasoma. Il coperchio è costituito da nove diverse subunità Rpn (Finley D. et al., 2016).

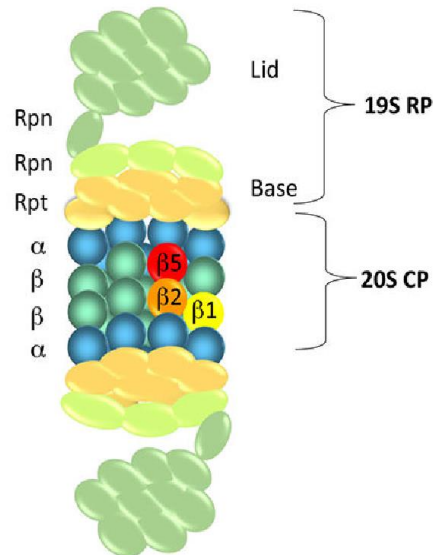


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura del proteasoma 26S. Esso è composto dalla particella centrale 20S (CP) e da quella regolatoria 19S (RP). Il core 20S ha 28 subunità che formano una struttura a botte con quattro anelli $\alpha\beta\beta\alpha$ eptamerici. Le tre subunità β_1 , β_2 e β_5 idrolizzano le proteine in piccoli peptidi. Il 19S RP comprende 19 proteine ed è ulteriormente suddiviso in due sottocomplessi aggiuntivi, la "base" e il "coperchio". La base è costituita da sei subunità ATPasi (Rpts) di particelle regolatorie AAA e da quattro subunità non ATPasi di particelle regolatorie (Rpns). Il coperchio è costituito da nove diverse subunità Rpn. (Myeku N. et al., 2017)

La degradazione delle proteine mediata dall'UPS prevede l'aggiunta covalente di una o più monomeri di ubiquitina tramite legame isopeptidico con l' ϵ -NH₂ di una catena laterale di lisina della proteina substrato. Più precisamente, il segnale di degradazione al proteasoma è mediato dalla polimerizzazione dell'ubiquitina sui residui Lisina-48 (K48). Il processo di ubiquitinazione viene effettuato attraverso una cascata enzimatica, che comprende l'azione sequenziale di tre enzimi: E1 (enzima attivatore dell'ubiquitina), E2 (enzima coniugante l'ubiquitina) ed E3 (ubiquitin ligasi) (Song L. et al., 2017; Hershko A. et al., 1998). Nel primo step l'enzima E1 si lega alla Glicina C-terminale dell'ubiquitina, con conseguente consumo di una molecola di ATP. Tale evento attiva l'ubiquitina che viene trasferita all'enzima E2 il quale, in cooperazione con enzimi appartenenti alla famiglia delle ubiquitin ligasi E3 attaccano specificatamente l'ubiquitina alla proteina bersaglio. L'ubiquitinazione è un processo reversibile, in cui l'azione delle ligasi è controbilanciata da enzimi deubiquitinanti, detti DUBs. Gli enzimi deubiquitinanti sono proteasi che possono agire in diverse fasi del processo di ubiquitinazione delle proteine: in una fase "iniziale", scindendo i precursori dell'ubiquitina; in uno stadio intermedio, rimuovendo frazioni di ubiquitina dalle proteine per alterarne il destino; in una fase finale mediante la rimozione delle catene di ubiquitina dai substrati indirizzati al proteasoma (Jacomin A.C. et al., 2018).

Alterazioni nel funzionamento dell'UPS correlano con l'insorgenza di malattie neurodegenerative, in quanto una disfunzione nel processo di turnover proteico può portare alla aggregazione delle proteine. Pertanto, negli ultimi decenni l'UPS è emerso come target per lo sviluppo di terapie risolutive. In particolare, una possibile e promettente via di intervento è rappresentata dagli enzimi deubiquitinanti associati al proteasoma, i quali ne regolano l'attività, come USP14.

1.2. La deubiquitinasi USP14

La proteasi 14 specifica dell'ubiquitina (USP14) è una delle tre DUBs (insieme a UCH37 e RPN11) associate al proteasoma nei mammiferi. USP14 comprende due domini strutturali, un dominio N-terminale Ubiquitin-Like (UBL) che regola l'attività del proteasoma, e un dominio USP catalitico C-terminale responsabile dell'attività enzimatica deubiquitinante (Shi Y. et al., 2016). Il dominio catalitico mostra una struttura simile ad una mano estesa, caratterizzata da tre sottodomini che costituiscono la fessura di legame dell'ubiquitina: il sottodominio Fingers, Palm e il sottodominio Thumb (Figura 1). In condizioni basali USP14 esiste in uno stato auto inibito con due anse di superficie, BL1 e BL2, le quali riempiono parzialmente la tasca di legame prevista per il C-terminale dell'ubiquitina (Hu M. et al., 2005), e al momento della sua associazione con il proteasoma, subisce un cambiamento conformazionale a livello di queste anse, consentendo l'accesso dell'ubiquitina C-terminale al sito attivo catalitico (Wang F. et al., 2021). Una volta attivo, USP14 è in grado di rimuovere l'ubiquitina K48 dai substrati proteici.

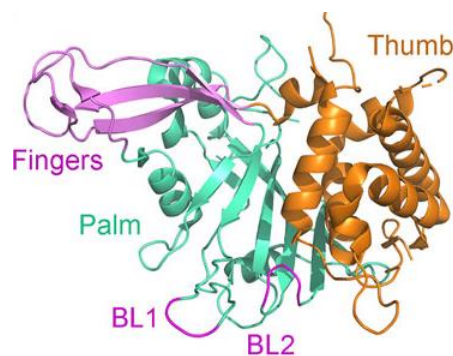


Figura 2: Struttura cristallina di USP14 nella forma inattiva, con i domini Fingers (in viola), Palm (in azzurro) e Thumb (in arancione). Le anse BL1 e BL2 sono indicate in viola (Frontiers)

In studi precedenti (Tanaka A. et al., 2010; Chan N.C. et al., 2011; Yoshii S.R. et al., 2011) è emerso che la mitofagia richiede una serie di processi chiave per essere attuata, ossia la localizzazione del proteasoma nei mitocondri depolarizzati, la degradazione delle proteine ubiquitinate della membrana mitocondriale esterna (OMM) e l'interruzione della membrana mitocondriale.

È stata dimostrata una correlazione tra la traslocazione del proteasoma ai mitocondri e la rottura della membrana mitocondriale con l'inibizione dell'USP14, questo enzima infatti influenza negativamente l'attività dell'UPS aumentando il tempo di permanenza delle proteine sul proteasoma.

In studi precedenti (Xu D. et al., 2016) è stato scoperto che USP14 regola non solo il complesso ubiquitina-proteasoma, ma anche il processo autofagico. USP14 può essere attivato mediante fosforilazione mediata da Akt, una proteina chinasi serina/treonina specifica coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare, del metabolismo, della trascrizione, della migrazione e dell'apoptosi (Xu D., 2015). Una volta attiva, regola negativamente l'autofagia rimuovendo le catene di ubiquitina K63 da Beclin 1, una proteina appartenente al complesso autofagico Vps34 (fosfatidilinositolo 3-chinasi). Nel lavoro di Chakraborty et al. è stato descritto che l'inibizione di USP14 induce un aumento della mitofagia, una forma selettiva di autofagia che comporta la rimozione dei mitocondri danneggiati. I mitocondri sono organelli essenziali per il sostentamento energetico della cellula ma sono anche fonte di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questi ultimi possono raggiungere livelli tali da condurre alla morte cellulare. Al fine di prevenire questo evento, la cooperazione tra il complesso ubiquitina-proteasoma e il macchinario autofagico diventa essenziale in termini di controllo della qualità mitocondriale: in caso di danni mitocondriali circoscritti alle proteine di membrana esterna, l'UPS elimina tali proteine (Livnat-Levanon N. et al., 2011) e ne facilita la rimozione qualora il loro posizionamento in membrana non sia corretto (Sulkshane P. et al., 2020). Viceversa, in caso di danni estesi all'interno organello, l'intervento del macchinario autofagico con la degradazione selettiva del mitocondrio danneggiato diventa l'alternativa più efficiente per preservare la fitness cellulare.

In quanto regolatore chiave che controlla sia l'UPS che l'autofagia, USP14 può essere un bersaglio interessante per migliorare anche modelli di mitofagia alterata.

1.3. Autofagia: un meccanismo per il controllo della qualità cellulare

L'autofagia è un processo cellulare auto-degradativo importante per bilanciare le fonti di energia durante lo sviluppo embrionale e in risposta alla deplezione di nutrienti (starvation); svolge ruolo fondamentale nella rimozione delle proteine mal ripiegate o aggregate e nella degradazione degli organelli danneggiati, nonché nell'eliminazione dei patogeni intracellulari (Glick D. et al., 2010),

Il meccanismo molecolare dell'autofagia consiste nella formazione di una vescicola, detta l'autofagosoma in cui vengono sequestrati i materiali citoplasmatici danneggiati. La formazione degli autofagosomi è guidata dalle proteine ATG e il sistema di coniugazione Atg8/MAP1LC3 (catena leggera 3 della proteina 1 associata ai microtubuli, denominata LC3), è essenziale nella fase di biogenesi e maturazione della vescicola autofagica. Il processo di sintesi

di tale vescicola è guidato dalla forma citosolica di LC3 (LC3-I), che viene coniugata alla fosfatidiletanolamina per formare coniugato LC3-fosfatidiletanolamina (LC3-II), il quale viene reclutato nelle membrane autofagiche (Tanida I. et al., 2008). L'autofagosoma matura attraverso la fusione con il lisosoma, promuovendo la degradazione del contenuto autofagosomiale. Il pH acido del lume lisosomiale presenta un'ampia varietà di idrolasi in grado di degradare un vasto spettro di substrati, questo rende i lisosomi macchinari straordinari per il riciclo dei rifiuti cellulari.

Le permeasi e i trasportatori lisosomiali esportano gli amminoacidi e altri sottoprodotti della degradazione nel citoplasma, dove possono essere riutilizzati per la costruzione di macromolecole e per il metabolismo. L'autofagia può essere considerata come una "fabbrica di riciclaggio" cellulare che promuove anche l'efficienza energetica attraverso la generazione di ATP e media il controllo dei danni rimuovendo proteine e organelli non funzionali.

1.4. L'asse TFEB-Calcineurina regola l'autofagia

Le disfunzioni nella via autofagia-lisosomiale (ALP) determinano l'aggregazione proteica e l'accumulo di organelli disfunzionali, eventi causativi o correlati a malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer (AD) o il morbo di Parkinson (PD) (Menzies F.M. et al., 2015).

Il fattore di trascrizione EB (TFEB) gioca un ruolo cardine nella regolazione dell'autofagia e della biogenesi lisosomiale. TFEB appartiene alla famiglia delle proteine MiT, che comprende diversi fattori di trascrizione. Tali fattori, compreso TFEB, condividono un dominio di base helix-loop-helix-leucine zipper (Bhlh-LZ) e legano i motivi del DNA della E-box nelle regioni dei promotori dei geni target per regolarne la trascrizione. Le principali funzioni delle proteine MiT includono la biogenesi del lisosoma e l'induzione dell'autofagia. Modulano inoltre il metabolismo cellulare e varie risposte allo stress (Kim S. et al., 2021; Aksan I. et al., 1998).

Studi precedenti (Medina D.L. et al., 2015) hanno dimostrato che TFEB induce i) la trascrizione di svariati geni coinvolti nell'autofagia appartenenti alla rete Coordinated Lysosomal Expression and Regulation (CLEAR) (Settembre C. et al., 2011; Sardiello M., et al., 2009), ii) la biogenesi dell'autofagosoma e iii) la fusione autofagosoma-lisosoma, promuovendo la clearance intracellulare.

In condizioni basali, TFEB è mantenuto inattivo nel citoplasma a causa della fosforilazione mediata dalla chinasi mTORC1 dei residui di serina di TFEB Ser142 e Ser211. Ciò promuove l'interazione di TFEB con la proteina 14-3-3 ed è localizzato nel citoplasma.

L'attività chinasi di mTORC1 è controbilanciata dall'azione della fosfatasi Calcineurina (CaN). CaN è una fosfatasi serin/treonina eterodimerica, costituita da una subunità catalitica, la calcineurina A, legante la calmodulina e una subunità regolatoria B legante lo ione calcio (Rusnak F. et al., 2000). Condizioni di starvation o di incremento dell'attività fisica scatenano il rilascio del Ca^{2+} dai lisosomi mediante il canale MCLN1. Il conseguente aumento del

calcio citoplasmatico attiva la CaN che defosforila TFEB, inducendone la traslocazione dal citoplasma al nucleo. In questo distretto, TFEB esercita la sua attività legandosi a geni coinvolti nella via ALP e regolandone la trascrizione.

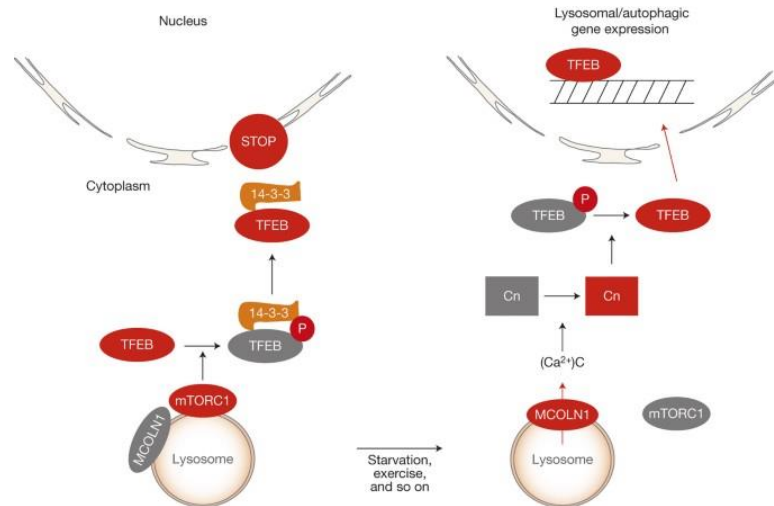


Figura 3: Rappresentazione schematica della via di segnalazione mediata da calcineurina e TFEB: in condizioni basali, TFEB è fosforilato sulla superficie lisosomiale da mTORC1 ed è sequestrato nel citoplasma dalle proteine 14-3-3. Durante la starvation, il calcio viene rilasciato dal lisosoma tramite MCOLN1. Questo porta all'attivazione della calcineurina e alla defosforilazione di TFEB, il quale non può più legare le proteine 14-3-3 e può traslocare nel nucleo per trascrivere i geni autofagici. (Nature Cell Biology)

2. SCOPO DELLO STUDIO

In un'analisi di spettrometria di massa precedentemente condotta nel nostro laboratorio si è rilevato un aumento dei livelli proteici della fosfatasi CaN in cellule iNeurons USP14 KO. In linea con i dati ottenuti in tali cellule, è stato anche osservato un significativo aumento dei livelli proteici di CaN nel modello cellulare HEK293.

Dato il ruolo centrale della CaN nel regolare il processo di autofagia-TFEB dipendente, abbiamo indagato la correlazione tra USP14 e il potenziale impatto sulla localizzazione cellulare di TFEB in cellule HEK293 e MEFs.

Nel replicato biologico presentato in questo studio, abbiamo riscontrato un aumento della traslocazione nucleare di TFEB-GFP in HEK293 USP14 KO. Ai fini di corroborare tale evidenza, l'analisi è stata condotta in parallelo anche su cellule in cui USP14 è stato inibito farmacologicamente tramite l'inibitore IU1-47, dove è stato osservato un fenotipo analogo. Viceversa, la reintroduzione di USP14 in HEK293 KO ha ripristinato l'indice di traslocazione nucleare di TFEB-GFP a valori più simili alle cellule wildtype.

Tale esperimento è stato traslato anche in MEFs in cui tuttavia non si è registrata una significativa differenza nella traslocazione nucleare di TFEB, così come negli esperimenti di frazionamento nucleare analizzati tramite Western Blot.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Colture cellulari

3.1.1. Fibroblasti embrionali di topo (MEFs)

Per questo studio sono stati impiegati fibroblasti embrionali di topo (Mouse Embryonic Fibroblasts MEFs). Le cellule sono state mantenute in coltura in terreno Eagle Modificato di Dulbecco (DMEM) (Gibco) con l'aggiunta di 50 U/ml penicillina, 50 µg/ml di streptomicina, 10% di siero fetale bovino (FBS), 2 mM L-glutammina e 1% di soluzione di aminoacidi non essenziali. Le cellule sono state mantenute in atmosfera controllata con CO₂ alla temperatura di 37 °C. Rispetto ad altre colture primarie di espianto, le cellule MEF sono più facili da mantenere, proliferano rapidamente e, di conseguenza, un gran numero di cellule può essere prodotto da un singolo embrione di topo entro diversi giorni dall'espianto. Sono cellule abbastanza piatte e aderenti, consentendo un facile monitoraggio della localizzazione delle proteine.

In questo studio è stata utilizzata una linea di MEFs USP14 knockout (USP14 KO), e la relativa linea wildtype come controllo (USP14 WT).

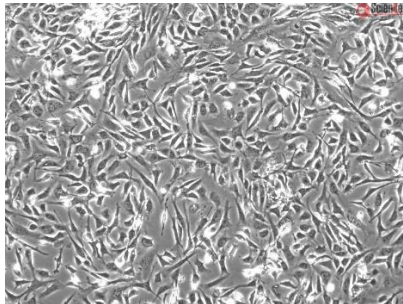


Figura 4: Mouse embryonic fibroblast (ScienCell)

3.1.2. Cellule di rene embrionale umano (HEK293)

La linea cellulare HEK293 è costituita da cellule renali embrionali umane; esse sono state coltivate in terreno Eagle Modificato di Dulbecco (DMEM) (Gibco) con l'aggiunta di 50 U/ml penicillina, 50 µg/ml di streptomicina, 10% di siero fetale bovino (FBS), 2 mM L-glutammina e 1% di soluzione di aminoacidi non essenziali.

In questo studio abbiamo impiegato la linea cellulare USP14 knockout (USP14 KO) e la relativa linea wildtype come controllo (USP14 WT).

ATCC Number: **CRL-1573**
Designation: **293**

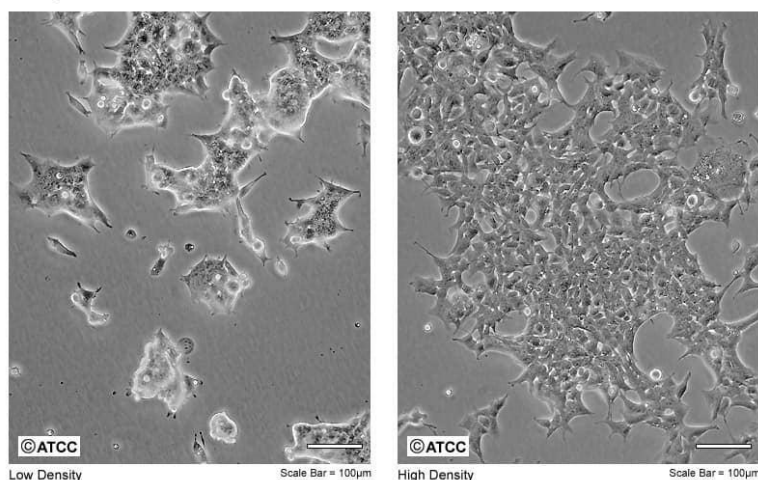


Figura 5: Human embryonic kidney 293 cells (ATCC)

3.1.3. Semina e trasfezione delle cellule

Per l'esperimento di traslocazione di TFEB-GFP in cellule HEK293, 2×10^5 cellule sono state piastrate in una piastra da 6 pozzetti su vetrini da microscopia, precedentemente rivestiti di gelatina.

Per trasfettare le cellule, abbiamo utilizzato il reagente PEI, un polimero cationico ad alta carica avente come corpo principale una polietilenimina lineare che può combinarsi in modo efficace con l'acido nucleico negativo. Per ogni condizione, $2,5 \mu\text{g}$ di DNA totali (TFEB-GFP o in combinazione con USP14-HA-Flag) sono stati risospesi in $125 \mu\text{l}$ di OptiMEM (Thermo Fisher Scientific). In parallelo, $10 \mu\text{l}$ di PEI (1 mg/ml, PolyScience) sono stati aggiunti a $125 \mu\text{l}$ di OptiMEM. Dopo aver unito le due soluzioni, la miscela è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente, per poi essere aliquotata direttamente sulle cellule. Dopo 24 ore dalla trasfezione, un pozzetto di HEK293 USP14 WT è stato trattato con IU1-47 $20 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich) per 24 ore prima dell'imaging. Per l'esperimento di traslocazione di TFEB-GFP in MEFs, $1,5 \times 10^5$ cellule sono state piastrate su vetrini da microscopia in una piastra da 6 pozzetti.

Per ogni condizione, $2 \mu\text{g}$ di TFEB-GFP sono stati risospesi in $100 \mu\text{l}$ di OptiMEM (Thermo Fisher Scientific). In parallelo, $8 \mu\text{l}$ di PEI (1 mg/ml, PolyScience) sono stati aggiunti a $100 \mu\text{l}$ di OptiMEM. Dopo aver unito le due soluzioni, la miscela è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente, per poi essere aliquotata direttamente sulle cellule. 24 ore dopo la trasfezione il terreno delle cellule è stato cambiato, e il pozzetto contenente le cellule MEF USP14 WT è stato trattato con $20 \mu\text{M}$ di IU1-47 (Sigma-Aldrich) per inibire la proteina USP14.

3.2. Estrazione del DNA

Dopo tre giorni di coltura cellulare, è stato prelevato un campione di cellule per ciascuna linea da testare. Le cellule sono state centrifugate a 5'000 x g per 5 minuti e successivamente il pellet è stato risospeso in 1 ml di PBS per eliminare eventuali residui di terreno. Come controllo negativo, è stato usato un campione di PBS senza cellule, mentre come controllo positivo un pellet cellulare in cui è stato rilevato del micoplasma in precedenza. La sospensione cellulare è stata sedimentata a 5'000 x g per 5 min e il surnatante rimosso. Ciascun pellet di cellule è stato poi risospeso in 500 µl di DNAZOL (Thermo Fisher Scientific) e lisato tramite pipettaggio. Sono stati aggiunti 250 µl di etanolo 100%, mescolando poi i campioni per inversione e incubati a temperatura ambiente per 3 minuti. Il pellet di DNA è stato ottenuto centrifugando i campioni a 5'000 x g per 5 minuti.

Dopo aver rimosso il surnatante, il DNA è stato lavato due volte con 1 ml di etanolo 75%. Un'ulteriore ciclo di centrifugazione ha permesso di rimuovere i residui di etanolo. I campioni sono stati esposti all'aria per favorire l'evaporazione di eventuali residui di etanolo e successivamente risospesi in acqua sterile. Il DNA è stato infine quantificato al Nanodrop.

3.2.2. PCR

La rilevazione dell'eventuale presenza di DNA di micoplasma è stata eseguita tramite PCR su DNA genomico isolato dalle colture cellulari in esame. I primer impiegati sono riportati in Tabella 1.

Primer	Sequenza	Temperatura di Melting (Forward/Reverse)
Micoplasma	Forward GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT Reverse TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC	55 °C/55 °C
Actina	Forward GGACTTCGAGCAAGAGATGG Reverse AGCACTGTGTTGGCGTACAG	59 °C/59 °C
GAPDH	Forward AGGTCGGTGTGAACGGATTTG Reverse TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	59.8 °C/58.9 °C

Tabella 1: Tabella riassuntiva dei primer impiegati per il test del micoplasma con relative sequenze e temperature di melting

La reazione di PCR è stata effettuata usando HOT FIREPol® Blend Master Mix (Solis Byodine) e seguendo le indicazioni del produttore. Il settaggio del termociclatore è riportato nella Tabella 2. Infine, i prodotti di PCR sono stati corsi e analizzati in gel d'agarosio al 1% e visualizzati al ChemiDoc (Bio-RAD).

FASI TERMOCICLATORE	TEMPERATURA	TEMPO	NUMERO DI CICLI
Denaturazione iniziale	94°C	2 min	1
Denaturazione	94°C	30 s	30
Appaiamento primers micoplasma	55°C (micoplasma) 59 °C (actina/GAPDH)	30 s	
Polimerizzazione	72°C	1 min	
Polimerizzazione finale	72°C	10 min	1

Tabella 2: Tabella rappresentativa del settaggio del termociclatore per la PCR.

3.3. Frazionamento nucleare

Il frazionamento nucleare da cellule si basa sull'utilizzo di due tamponi a diversa forza ionica: con il primo tampone (Buffer A), iposmotico, le cellule liberano il loro contenuto citoplasmatico in soluzione; si possono quindi recuperare i nuclei cellulari intatti dai quali le proteine vengono liberate mediante incubazione con una soluzione iposmotica (Buffer B).

Due giorni prima dell'estrazione, 2 milioni di MEFs sono state piastrate in dish da 10 cm. Il giorno successivo una piastra di MEFs USP14 WT è stata trattata con IU1-47 alla concentrazione di 20 μ M per 24 ore, mentre il corrispondente controllo e una piastra di USP14 KO con DMSO.

Dopo aver rimosso il terreno, le cellule MEF sono state lavate con 10 ml di PBS freddo e rimosso. Per ogni pozzetto sono stati aggiunti 500 μ l di Buffer A (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM DTT, inibitori di proteasi e fosfatasi) direttamente sulle dish e incubate a temperatura ambiente per dieci minuti.

Le cellule sono state raccolte utilizzando uno scraper e si è pipettato delicatamente per favorire la lisi delle membrane plasmatiche. Il lisato così ottenuto è stato successivamente centrifugato alla massima velocità per 3 minuti a 4 °C per ottenere i nuclei intatti (nel pellet) e la frazione citosolica (nel surnatante). Quest'ultimo è stato quindi prelevato e conservato a -20 °C mentre il pellet è stato risospeso in 150 μ l di Buffer B (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, Glicerolo 10%, DTT 1 mM, inibitori di proteasi e fosfatasi)

I campioni sono stati incubati nel ghiaccio per due ore e vortexati ogni 15 minuti per disgregare le membrane nucleari, rilasciandone il contenuto proteico. I lisati sono stati infine centrifugati a 15'000 g per 5 minuti e conservato il surnatante (frazione nucleare).

3.4. Western Blot

Il Western blot è una tecnica usata per rilevare, analizzare e quantificare proteine specifiche in campioni complessi come lisati cellulari. Le

concentrazioni proteiche dei campioni ottenuti precedentemente sono state quantificate utilizzando Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC).

Le proteine, previamente denaturate a 95 °C x 5 min in Laemmli, sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodiododecilsolfato (SDS-PAGE). L'allestimento del gel per l'elettroforesi in SDS prevede la preparazione di uno "stacking" gel (o gel di impaccamento) la cui funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato nei pozzetti, in modo che tutte le proteine presenti nella miscela inizino la loro migrazione dallo stesso punto di partenza e un "running" gel (gel di separazione) la cui funzione è quella di separare le proteine del campione in base al loro peso molecolare. Dopo l'esecuzione dell'elettroforesi, le proteine sono state blottate dalla matrice di gel su membrane di trasferimento di fluoruro di polivinilidene (PVDF) che sono state preattivate in metanolo 100%. Ai fini di verificare l'efficienza del trasferimento, la membrana è stata incubata con una soluzione di Ponceau S e poi lavata con TBS-T 0,05% per rimuovere i residui della soluzione. Per ridurre al minimo il legame non specifico, le membrane sono state quindi poste in una soluzione di bloccaggio con 5% di latte in polvere senza grassi in tampone TBS-T 0.05% e incubato a temperatura ambiente in costante agitazione. Dopo un'ora, la membrana è stata tagliata in sezioni e ogni parte incubata con l'anticorpo corrispondente (α -PARP, 1:2000; α -TFEB, 1:3000, α -GAPDH, 1:5000). L'anticorpo Parp è stato impiegato come marker nucleare, mentre GAPDH come marker citoplasmatico.

Dopo l'incubazione overnight, le membrane sono state lavate 3 volte con TBS-Tween 0.05% per 10 minuti per poi effettuare l'incubazione con l'anticorpo secondario, diluito in TBS-T 1:3000. Si sono successivamente ripetuti i medesimi lavaggi prima di rilevare il segnale mediante chemiluminescenza.

3.5. Imaging

3.5.1. Imaging confocale

Per gli esperimenti di imaging confocale volti ad analizzare la localizzazione di TFEB, si è impiegato il plasmide TFEB-GFP. Tale costrutto è stato eccitato con un laser di lunghezza d'onda di 488 nm e usando un obiettivo UPlanSApo 60x/1,35 (iMIC Andromeda). Sono stati acquisiti stack di immagini separati da 0,2 μ m lungo l'asse z. Per la quantificazione delle immagini, è stato impiegato il software ImageJ.

3.5.2. Analisi delle immagini con ImageJ

ImageJ è un programma di elaborazione di immagini open source progettato per immagini multidimensionali scientifiche. Dopo aver messo a fuoco

l'immagine da analizzare all'interno dello stack, la si isola come singola immagine. Tramite lo strumento di selezione circolare, si selezionano delle aree rappresentative (dette *regions of interest*, ROI) di nucleo e citoplasma cellulari.

I valori relativi all'area selezionata vengono registrati in un foglio di calcolo: essi rappresentano una scala di grigi ossia una interpretazione numerica dell'intensità dei due segnali. Calcolando il rapporto tra il segnale nucleare rispetto a quello citoplasmatico, si ottiene un valore definito Nuclear SNR (signal to noise ratio).

4. RISULTATI

4.1. L'espressione di USP14 regola i livelli della fosfatasi calcineurina

I dati derivanti da un'analisi di spettrometria di massa precedentemente condotta nel laboratorio hanno rilevato una correlazione tra la deubiquitinasi USP14 e i livelli della fosfatasi Calcineurina (CaN). In particolare, in iNeurons knockout per USP14 (iNeurons USP14 KO), si è riscontrato un significativo aumento dell'isoforma PPP3CA della CaN rispetto ai relativi controlli (dato non mostrato).

Questa evidenza ha trovato riscontro anche in HEK293, nelle quali i livelli proteici di CaN sono stati analizzati tramite Western Blot. In questa linea cellulare, l'ablazione genica di USP14 (USP14 KO) è legata ad un significativo aumento dei livelli proteici di CaN (Figura 6). D'altro canto, la reintroduzione ectopica di USP14-HA in tali cellule ha abbassato tali livelli anche se non in modo significativo. Non è tuttavia da escludere che l'aumento del numero di replicati biologici possa confermare il trend osservato.

In parallelo, si sono saggiati i livelli di CaN a seguito dell'inibizione farmacologica di USP14, mediata dall'inibitore IU1-47. IU1-47, variante dell'inibitore IU1, è un inibitore potente e specifico per USP14. Il trattamento con IU1-47 induce un aumento del tasso di degradazione di un sottoinsieme di substrati del proteasoma.

Nel nostro caso, tuttavia, l'inibizione di USP14 non ha riprodotto i valori osservati nelle cellule USP14 KO, anche se è osservabile un trend verso un innalzamento nei livelli di espressione proteica di CaN.

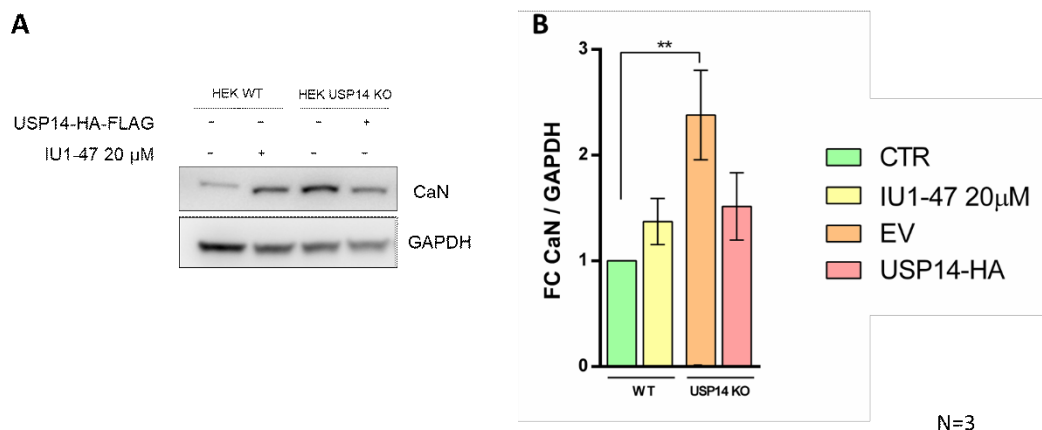


Figura 6: (A) Western blot relativo ai livelli proteici di CaN in HEK293. Il marker citosolico GAPDH è stato impiegato come controllo di caricamento (B) Il grafico a barre mostra la quantificazione di (A). N=3.

Incoraggiati da tali evidenze, abbiamo esteso quest'analisi ad un altro modello cellulare: fibroblasti embrionali murini (MEFs).

L'esperimento è stato condotto una sola volta ma ha rivelato un aumento di oltre il 50% dei livelli di CaN in assenza di USP14. Analogamente ai dati ottenuti in HEK293, il trattamento con IU1-47 non riproduce un effetto altrettanto evidente (Figura 7). Tuttavia, ulteriori replicati biologici saranno necessari per confermare questo dato preliminare.

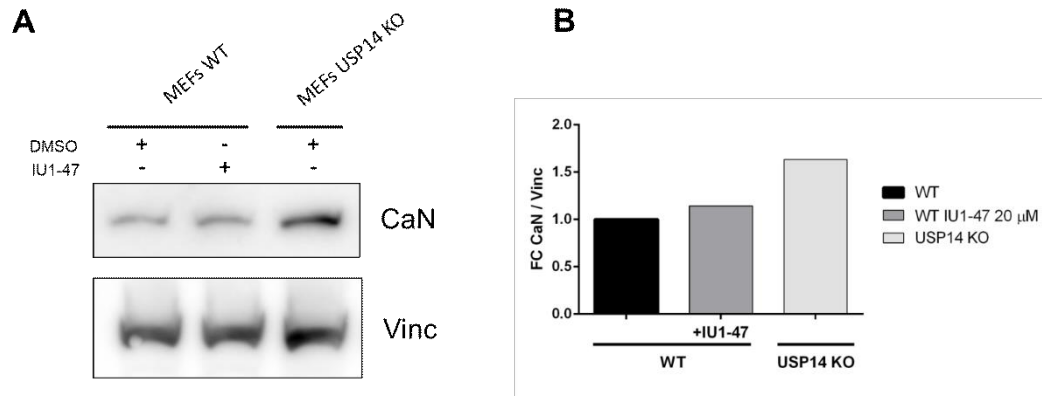


Figura 7: (A) Western blot relativo ai livelli proteici di CaN in MEFs. Il marker citosolico GAPDH è stato impiegato come controllo di caricamento (B) Il grafico a barre mostra la quantificazione di (A). N=1.

Prima di procedere con ulteriori esperimenti, abbiamo verificato che le linee impiegate per questo studio (HEK293 e MEFs) fossero esenti da una specifica specie batterica: il micoplasma. La presenza di micoplasma nelle colture cellulari può impattare su svariati processi cellulari, come metabolismo, sintesi di biomolecole o proliferazione. I micoplasmi sono privi di parete cellulare e quindi non sono sensibili alle penicilline o ad altri antibiotici che agiscono su questa struttura (Hans G. Drexler, Cord C. Uphoff, 2002). Ciò consente loro di proliferare nei terreni di coltura, raggiungendo titoli elevati senza provocare i tipici sintomi di contaminazione batterica, come la torbidità del terreno. Pertanto, uno dei metodi impiegati per la rilevazione di questo microrganismo prevede l'impiego di una PCR (polymerase chain reaction) con primer specifici per il micoplasma.

I risultati della PCR mostrano che in entrambe le linee cellulari HEK e MEFs non è presente DNA di micoplasma e risultano pertanto mycoplasma-free. La comparsa di una banda a circa 270 bp nel controllo positivo e l'assenza di tale banda nel controllo negativo processati in parallelo assicurano la corretta esecuzione del protocollo.

Ad ulteriore controllo dell'effettiva estrazione di DNA, si è inoltre indagata la presenza di DNA eucariote con primer specifici per gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) per le MEFs e Actina per le HEK293 (Figura 8).

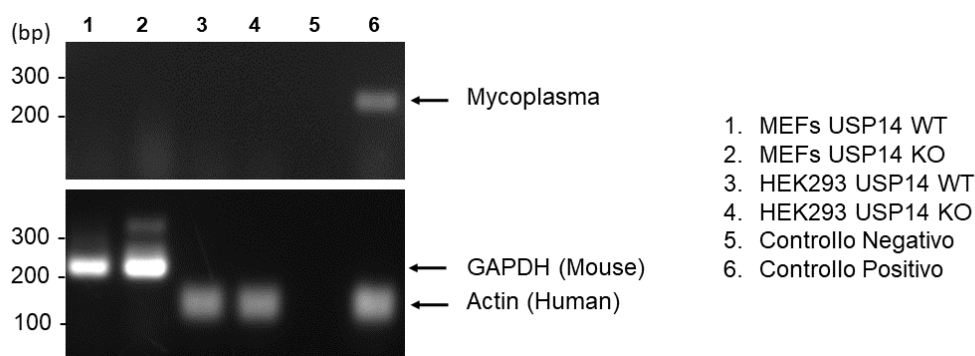


Figura 8: Risultati della PCR per il rilevamento del micoplasma. GAPDH è stato impiegato come controllo del caricamento di DNA per le MEFs e l'actina come controllo di caricamento del DNA per le HEK293.

4.2. Analisi della traslocazione nucleare di TFEB nelle cellule HEK293

Nel lavoro di Medina et al. si evince il ruolo cardine della fosfatasi CaN nel regolare la traslocazione di TFEB al nucleo. La CaN viene attivata dall'aumento del calcio citoplasmatico, il quale viene rilasciato dai lisosomi mediante il canale MCLNO1 durante le condizioni di starvation cellulare o durante l'esercizio fisico. Una volta attiva, la CaN defosforila TFEB promuovendo la sua traslocazione nel nucleo. Considerato l'aumento dei livelli proteici di tale fosfatasi a seguito dell'ablazione genica di USP14, esperimenti di *nuclear fractionation* precedentemente condotti in laboratorio hanno investigato se l'assenza di USP14 fosse correlata ad un aumento della traslocazione nucleare di TFEB. La proteina PARP è stata impiegata come marker nucleare, mentre l'enzima GAPDH come marker citosolico per verificare la purezza delle preparazione ottenute.

In HEK293 USP14 KO si è rilevato un trend che suggerisce un aumento della traslocazione nucleare di TFEB, seppur non significativo ($p\text{-value} > 0.06$), così come a seguito dell'inibizione farmacologica di USP14, mediata da IU1-47 (Figura 9). D'altro canto, l'espressione ectopica della deubiquitinasi in HEK293 ha ripristinato i livelli di TFEB nucleare a valori più simili a quelli delle cellule wildtype, ma anche in questo caso la differenza non è risultata significativa (Figura 9B).

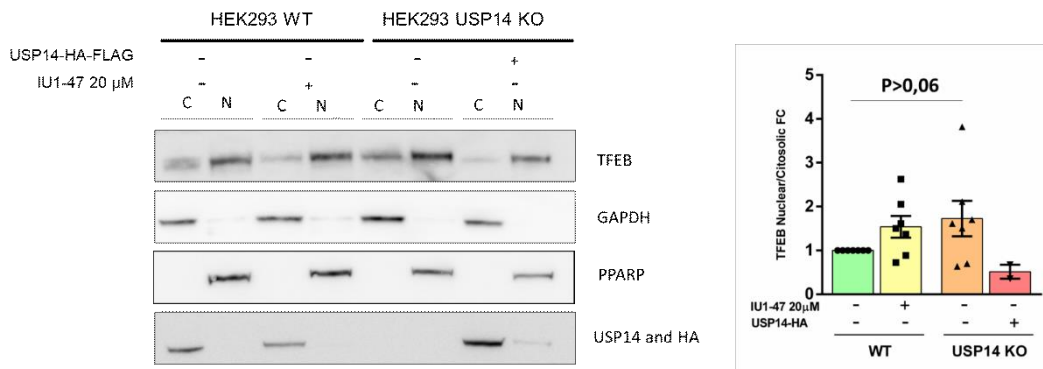


Figura 9: (A) Frazionamento nucleare analizzato tramite Western blot relativo ai livelli proteici di TFEB in HEK293 nel nucleo e nel citoplasma. (B) Il grafico a barre mostra la quantificazione di (A).

Un secondo approccio per valutare la traslocazione nucleare di una proteina è tramite microscopia. Tale approccio prevede l'espressione di un tag fluorescente in fusione con la proteina di interesse. Rispetto all'approccio del frazionamento biochimico, la microscopia consente di effettuare l'analisi in cellule vive, mantenendo così la localizzazione della proteina nel compartimento corretto, mentre nel frazionamento nucleare, la rottura meccanica della membrana plasmatica può impattare sull'integrità di quella nucleare.

Nel nostro caso, abbiamo quindi trasfettato le HEK293 con la proteina TFEB-GFP e acquisito le immagini al microscopio confocale.

In linea generale, le cellule trasfettate presentavano una distribuzione del segnale fluorescente ripartita tra citoplasma e nucleo, con una differenza di intensità tra i due compartimenti variabile da cellula a cellula (Figura 10A). Tramite il software ImageJ è stato quantificato il valore medio di intensità di fluorescenza di una regione campionata nel nucleo e rapportata al valore di intensità di fluorescenza del citoplasma. Il rapporto tra le due misure è stato definito Signal to Noise Ratio (SNR) ed è direttamente proporzionale alla frazione di TFEB nucleare rispetto a quella citosolica. L'analisi è stata condotta su un unico replicato biologico ma questo dato preliminare rivela un aumento significativo del SNR in HEK293 USP14 KO rispetto alle corrispettive cellule wildtype, così come a seguito del trattamento con IU1-47 (Figura 10). Viceversa, la reintroduzione di USP14 in HEK USP14 KO ripristina l'indice di traslocazione nucleare di TFEB a valori comparabili a quelli delle HEK di controllo.

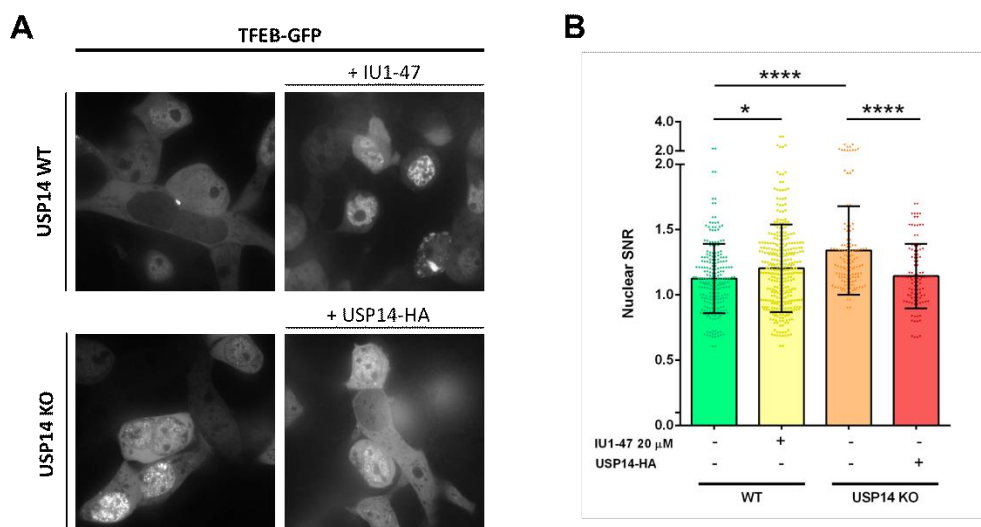


Figura 10: (A) Immagine rappresentativa della localizzazione cellulare e di TFEB-GFP in HEK293. (B) Il grafico a barre mostra l'SNR relativo a (A). SDEV, N=1, analisi statistica con One-way Anova.

Questo esperimento è stato condotto solo una volta per problemi tecnici legati all'adesione delle HEK al vetrino; tuttavia, l'elevata percentuale di trasfezione ha consentito di analizzare più di 100 cellule per condizione. Questi dati preliminari suggeriscono che USP14 giochi un ruolo determinante nel regolare la traslocazione di TFEB al nucleo nelle HEK293.

4.3. Analisi della traslocazione nucleare di TFEB in MEFs

Nell'ottica di consolidare i dati ottenuti in HEK293, abbiamo deciso di estendere l'analisi della traslocazione nucleare di TFEB anche in MEFs.

In questa linea, tuttavia, si sono riscontrati dei problemi tecnici relativamente all'isolamento della frazione nucleare: l'analisi tramite Immunoblot ha rilevato contaminazioni della proteina nucleare PARP all'interno della frazione citoplasmatica (Figura 11A).

In ogni caso, questo dato preliminare non ha rilevato un aumento della localizzazione nucleare di TFEB a seguito dell'ablazione o inibizione farmacologica di USP14 (Figura 11B), diversamente da quanto era stato riscontrato in HEK.

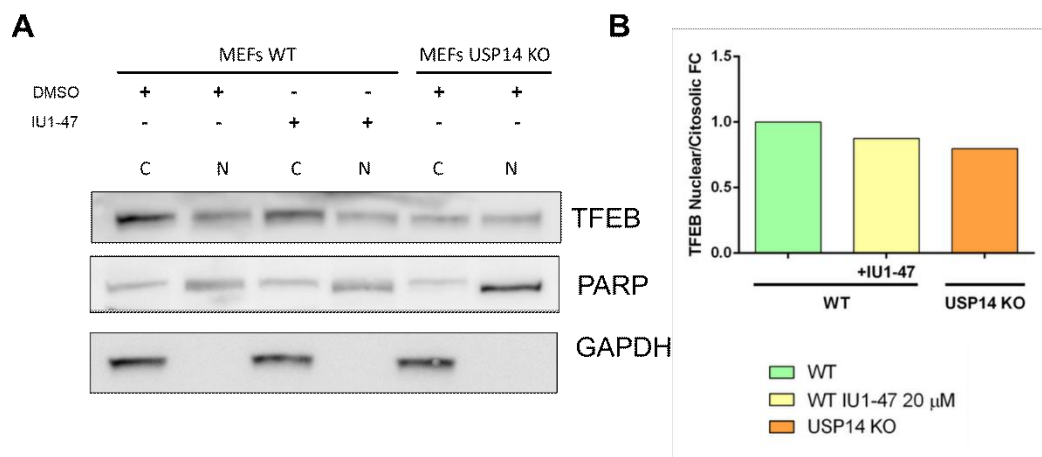


Figura 11: (A) Frazionamento nucleare analizzato tramite Western blot relativo ai livelli proteici di TFEB in MEFs nel nucleo e nel citoplasma. (B) Il grafico a barre mostra la quantificazione di (A).

Il risultato di quest'analisi preliminare ha trovato riscontro anche nella quantificazione della traslocazione di TFEB-GFP in cui non abbiamo registrato un significativo aumento della traslocazione nucleare di TFEB in MEFs USP14 KO, così come a seguito del trattamento con IU1-47 (Figura 12B). In questo caso l'analisi è stata condotta su tre replicati biologici, per un totale di circa 60 cellule.

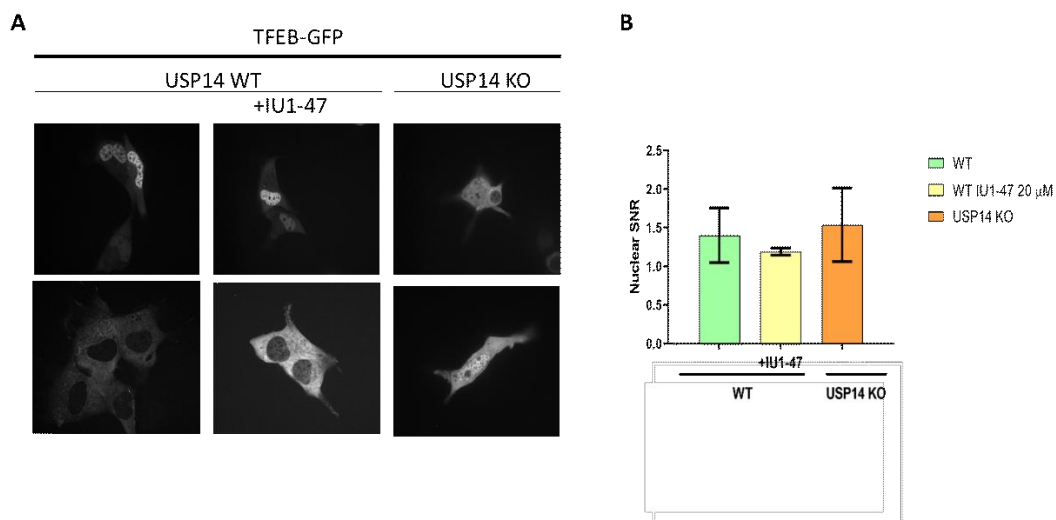


Figura 12: (A) Immagine rappresentativa della localizzazione cellulare e di TFEB-GFP in MEFs. (B) Il grafico a barre mostra l'SNR relativo a (A). SEM, N=3, analisi statistica con One-way Anova.

5. DISCUSSIONE

L'autofagia e il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) sono i due principali meccanismi degradativi intracellulari che regolano l'omeostasi cellulare negli Eucarioti. L'UPS media la degradazione delle proteine di breve durata coniugate con le catene di ubiquitina K48 (Kaulich E. et al., 2008), mentre l'autofagia media il turnover delle proteine di lunga durata e degli organelli cellulari. Questi ultimi vengono prima incapsulati negli autofagosomi e successivamente si fondono con i lisosomi per consentire la degradazione da parte delle proteasi lisosomiali.

L'UPS e l'autofagia sono funzionalmente interconnessi, coordinando la loro azione nella proteostasi e nell'omeostasi degli organelli. In entrambi i processi l'ubiquitinazione rappresenta uno step regolativo importante in qualità di segnale per la degradazione dei target. L'ubiquitinazione dei substrati proteici è un processo reversibile, poiché le catene di ubiquitina possono essere rimosse dall'azione degli enzimi deubiquitinanti (DUBs). Ad esempio, è stato dimostrato che la proteasi-14 specifica dell'ubiquitina (USP14), un DUB associato in modo reversibile al proteasoma, ne regola negativamente l'attività rimuovendo le catene di ubiquitina K48 da substrati legati al proteasoma (Borodovsky A. et al., 2001). USP14 inoltre regola negativamente anche il processo autofagico, rimuovendo le catene di ubiquitina K63 da Beclin1, una proteina che insieme a Vps34 e Vps15 forma un complesso chiave per la maturazione dell'autofagosoma. L'espressione di geni autofagici (quali Beclin1) e di geni coinvolti nella biogenesi lisosomiale è legata all'attività del Fattore di Trascrizione EB (TFEB). TFEB è stato descritto all'interno di una via di segnalazione che coinvolge il rilascio di calcio lisosomiale. Tale evento attiva la fosfatasi calcio dipendente Calcineurina (CaN), la quale defosforila TFEB attivandolo e permettendone la traslocazione al nucleo cellulare.

E' interessante notare che dall'analisi di spettrometria di massa condotta dal nostro laboratorio si è rilevata una correlazione tra l'espressione di USP14 e la Calcineurina; in particolare, in iNeurons knockout per USP14 (iNeurons USP14 KO), si è riscontrato un significativo aumento dell'isoforma PPP3CA della CaN rispetto ai relativi controlli.

Tramite Western Blot si è riscontrata tale evidenza anche nelle cellule HEK293 KO per USP14. La reintroduzione ectopica di USP14-HA ha abbassato i livelli proteici di CaN anche se non in modo significativo. Dati preliminari ottenuti nelle cellule MEFs ha suggerito un trend analogo, con un aumento dei livelli di CaN in assenza di USP14. L'inibizione di USP14 tramite il trattamento con IU1-47 non ha riprodotto i dati derivanti dall'ablazione genica, ma ciò potrebbe essere riconducibile ad un'azione meno efficace dell'inibizione chimica rispetto ad un approccio di rimozione totale del gene.

Poiché USP14 è un enzima deubiquitinante che salvaguarda le proteine destinate alla degradazione tramite proteasoma, è ragionevole pensare che la CaN non sia un target diretto dell'attività deubiquitinante di tale DUB, in quanto l'ablazione di USP14 induce un aumento significativo dei livelli di CaN, anziché una diminuzione. È quindi possibile che l'aumento dei livelli intracellulari della fosfatasi sia legato ad un effetto indiretto della deplezione di USP14. Allo stato attuale, nella letteratura scientifica non sono disponibili

molti studi circa stimoli o proteine che regolino i livelli proteici della CaN. Tra questi si contempla il lavoro di Alba et al., in cui si suggerisce che lo stato redox cellulare possa modulare l'espressione della fosfatasi nei neutrofili. In linea con questa evidenza, nella proteomica condotta su iNeurons alcuni enzimi antiossidanti quali HMOX e catalasi risultano significativamente ridotti. Tuttavia, non è chiaro l'impatto dell'attivazione del proteasoma sullo stato redox cellulare, poiché in letteratura si riscontrano evidenze discordanti (Maharjan S., et al., 2014; Yamamoto N., et al., 2007). Queste speculazioni necessitano quindi di studi mirati a chiarire il potenziale impatto di USP14 sui livelli di stress ossidativo tramite il proteasoma. Inoltre, non è da escludere che USP14 regoli i livelli di proteine che impattino negativamente sull'espressione della CaN.

L'aumento dei livelli proteici della fosfatasi CaN a seguito dell'ablazione genica di USP14 e il ruolo di questa fosfatasi all'interno dell'asse TFEB-autofagia, ci ha spinti a indagarne un potenziale impatto sulla traslocazione di TFEB al nucleo. In HEK293 USP14 KO si è osservato un trend che suggerisce un aumento della traslocazione nucleare di TFEB, seppur non significativo, così come a seguito dell'inibizione chimica di USP14, mediata da IU1-47. L'espressione ectopica della deubiquitinasi in HEK293 ha ripristinato i livelli di TFEB nucleare a valori più simili a quelli delle cellule wildtype, ma anche in questo caso la differenza non è risultata significativa. L'approccio tramite microscopia con quantificazione della traslocazione di TFEB-GFP, che è stata condotta su un unico replicato biologico delle HEK293, ha fatto emergere un aumento significativo del SNR in HEK293 USP14 KO rispetto alle corrispettive cellule wildtype, così come a seguito del trattamento con IU1-47. Viceversa, la reintroduzione di USP14 in HEK USP14 KO ripristina l'indice di traslocazione nucleare di TFEB a valori comparabili a quelli delle HEK di controllo.

I dati relativi alle MEFs non hanno mostrato un aumento della localizzazione nucleare di TFEB a seguito dell'ablazione o inibizione chimica di USP14, diversamente da quanto era stato riscontrato in HEK; questo risultato ha trovato riscontro anche nella quantificazione della traslocazione di TFEB-GFP. In questa linea, tuttavia, si sono riscontrati dei problemi tecnici relativamente alle condizioni sperimentali; oltre ad una più bassa efficienza di trasfezione rispetto alle HEK, la fitness generale delle MEFs trasfettate sembrava risentire maggiormente delle condizioni sperimentali impiegate, rendendo necessario un aggiustamento delle stesse.

L'identificazione di un meccanismo mediante il quale USP14 regola l'autofagia attraverso l'attivazione della fosfatasi calcineurina e del fattore di trascrizione TFEB, supporta ulteriormente il ruolo di USP14 nei meccanismi di controllo della qualità e riciclo dei componenti intracellulari.

Disfunzioni nell'UPS e/o nel processo autofagico determinano l'aggregazione proteica e l'accumulo di organelli disfunzionali, i quali sono correlati alla fisiopatologia di malattie neurodegenerative come, ad esempio, il Morbo di Parkinson (Ciechanover A. et al., 2015). La modulazione dell'attività di USP14 potrebbe essere centrale nello sviluppo di un approccio terapeutico mirato alla risoluzione di patologie per le quali al momento non esiste una cura. A tal

proposito, si sono già ottenuti risultati incoraggianti in *Drosophila Melanogaster* in cui l'inibizione farmacologica di USP14 ha corretto disfunzioni mitocondriali e locomotorie in moscerini con fenotipo parkinsoniano (Chakraborty et al.).

6. BIBLIOGRAFIA

Aksan I., Goding C.R. (1998) Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-Box elements *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol.* 18(12), 6930-6938.

Alba G., *et al.* (2012) Calcineurin expression and activity is regulated by the intracellular redox status and under hypertension in human neutrophils. *Journal of Endocrinology.* 214(3), 399-408.

Borodovsky A., *et al.* (2001) A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *EMBO J.* 20(18), 5187-5196.

Chakraborty J., von Stockum S., Marchesan E., Caicci F., Ferrari V., Rakovic A., Klein C., Antonini A., Bubacco L., Ziviani E. (2018) USP14 inhibition corrects an *in vivo* model of impaired mitophagy. *EMBO Mol Med.* 10(11), e9014.

Chan N.C., *et al.* (2011) Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet.* 1;20(9), 1726-37.

Chen J., Chen X., Xu D., *et al.* (2020) Autophagy induced by proteasomal DUB inhibitor NiPT restricts NiPT-mediated cancer cell death. *Front Oncol.* 10-348.

Ciechanover A., Kwon Y.T. (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med.* 47(3), e147.

Drexler H.G., Uphoff C.C. (2002) Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology.* 39, 75-90.

Finley D., Chen X., Walters K.J. (2016) Gates, channels, and switches: elements of the proteasome machine. *Trends Biochem Sci.* 41(1), 77-93.

Glick D., Barth S., Macleod K.F. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanism. *J Pathol.* 221(1), 3-12.

Hershko A., Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67, 425-79.

Hu M., *et al.* (2005) Structure and mechanism of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J.* 24(21), 347-3756.

Jacomin A.C., Taillebourg E., Fauvarque M.O. (2018) Deubiquitinating enzymes related to autophagy: new therapeutic opportunities? *Cells.* 7(8), 112.

Kim S., *et al.* (2021) MiT family transcriptional factors in immune cell functions. *Mol Cells.* 44(5), 342-355.

Kocaturk N.M., Gozuacik D. (2018) Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Front. Cell Dev. Biol.* 2, 6- 128.

Koulich E., *et al.* (2008) Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell.* 19(3), 1072-82.

- Livnat-Levanon N., Glickman M.H. (2011) Ubiquitin-proteasome system and mitochondria-reciprocity. *Biochim Biophys Acta.* 1809(2), 80-7.
- Maharjan S., *et al.* (2014) Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Scientific Reports.* 4, 5896.
- Medina, L., D., *et al.* (2015) Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol.* 17(3), 288-299.
- Menzies F.M., Fleming A., Rubinsztein D.C. (2015) Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience.* 16, 345-357.
- Myeku N., *et al.* (2018) Targeting the 26S proteasome to protect against proteotoxic diseases. *Trends Mol Med.* 24(1), 18-29.
- Rusnak F., Mertz P. (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 80(4), 1483-521.
- Sardiello M., *et al.* (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science.* 325(5939), 473-7.
- Settembre C., *et al.* (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science.* 332(6036), 1429-1433.
- Shi Y., *et al.* (2016) Rpn1 provides receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science.* 351(6275).
- Song L., Luo Z.Q. (2019) Post-translational regulation of ubiquitin signaling. *J Cell Biol.* 218(6), 1776-1786.
- Sulkshane P., Ram J., Glickman M.H. (2020) Ubiquitination of intramitochondrial proteins: implications for metabolic adaptability. *Biomolecules.* 10(11), 1559.
- Tanaka A., *et al.* (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol.* 191(7), 1367-1380.
- Tanida I, Ueno T., Kominami E. (2008) LC3 and autophagy. *Methods Mol Biol.* 445, 77-88.
- Wang F., Ning S., *et al.* (2021) USP14: structure, function and target inhibition. *Front Pharmacol.* 12, 801328.
- Xu D., *et al.* (2015) Phosphorylation and activation of ubiquitin-specific protease-14 by Akt regulates the ubiquitin-proteasome system. *eLife.* 4, e10510.
- Xu D., *et al.* (2016) USP14 regulates autophagy by suppressing K63 ubiquitination of Beclin 1. *Genes Dev.* 30(15), 1718-1730.
- Yamamoto N., *et al.* (2007) Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry.* 282(7), 4364-4372.
- Yoshi S.R., *et al.* (2011) Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 286(22), 19630-19640.

7. RINGRAZIAMENTI

Vorrei dedicare questo spazio a chi mi è stato vicino durante la mia carriera universitaria.

In primis ringrazio la mia relatrice Elena Ziviani per avermi accolta nel suo laboratorio e avermi quindi permesso di lavorare a fianco di persone brillanti e appassionate; la ringrazio anche per aver mostrato sempre molta disponibilità e gentilezza e attenzione nei miei confronti.

Ringrazio la mia cotutor Elena Marchesan per essere stata paziente e sempre disponibile nel risolvere i miei dubbi e nel rispondere alle mie domande. La ringrazio per l'aiuto concessomi nello scrivere l'elaborato di laurea e per avermi fatto lavorare al suo fianco trattandomi come una sua pari nonostante la mia poca esperienza in laboratorio, permettendomi di arricchire le mie conoscenze.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, a mio padre Gianluca, a mia madre Sandra e a mio fratello Gianmarco. Mi hanno sempre incoraggiata a seguire la mia strada e aiutata durante questo percorso. Grazie a loro ho raggiunto questo primo importante traguardo per la realizzazione dei miei progetti. Senza il loro affetto e il loro sostegno, non sarei arrivata qui oggi.

Ci tengo a ringraziare tutti i miei parenti per il sostegno che mi hanno sempre dato, e in particolar modo ringrazio mio nonno Diego, il quale ha aiutato i miei genitori a sostenere la mia carriera universitaria, e il quale ha sempre creduto in me e nelle mie capacità.

Grazie al mio ragazzo, Stefano, per avermi sempre ascoltata, per avermi sostenuta, per aver gioito con me dei miei successi e per avermi consolata nei miei fallimenti, incoraggiandomi a dare il meglio di me sempre. Grazie a lui ho acquisito grande fiducia in me stessa.

Grazie alle mie care amiche Giulia, Emma, Francesca e Beatrice per essermi sempre state vicine nel corso di questo capitolo della mia vita. Un sentito ringraziamento va a Emma, amica con la quale ho condiviso sogni e speranze e che mi ha sempre sostenuta nelle mie scelte e mi ha sempre supportata nei momenti di difficoltà.