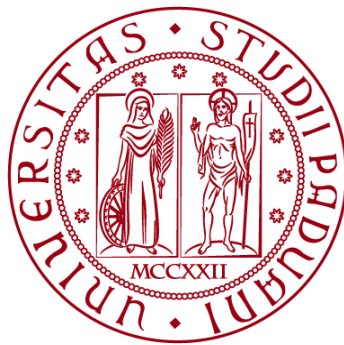


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia**



**ELABORATO DI LAUREA**

## **Studio dell'interazione tra la fosfatasi Calcineurina e l'ubiquitin ligasi Parkin**

**Tutor:** Prof.ssa Elena Ziviani, Dipartimento di Biologia

**Cotutor:** Dott.ssa Elena Marchesan, Dipartimento di Biologia

**Laureanda:** Beatrice Capita

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



## Sommario

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 I mitocondri</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 L'asse PINK1-Parkin regola la mitofagia</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 PINK1: struttura e funzione .....	6
1.2.2 Parkin: struttura e funzione .....	7
<b>1.3 Calcineurina</b> .....	<b>8</b>
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>9</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1. Colture cellulari</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2. Semina delle cellule e Trasfezione transiente</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3. Estrazione del DNA plasmidico (Midi-Prep)</b> .....	<b>10</b>
<b>3.4. Estrazione proteica</b> .....	<b>11</b>
<b>3.5. Co-immunoprecipitazione</b> .....	<b>12</b>
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>13</b>
<b>4.1. La Calcineurina regola la traslocazione di Parkin ai mitocondri indipendentemente da PINK1</b> .....	<b>13</b>
<b>4.2. L'attivazione della CaN influenza i livelli proteici dei target mitocondriali di Parkin</b> 15	
<b>4.3. La Calcineurina interagisce con Parkin a seguito del trattamento con CCCP</b> 19	
<b>4.4. Indagine del residuo target della Calcineurina su Parkin</b> .....	<b>20</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>24</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>27</b>



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I mitocondri

I mitocondri sono organelli cellulari a doppia membrana presenti nelle cellule eucariotiche. I mitocondri sono formati da una membrana mitocondriale esterna (MME) e una membrana mitocondriale interna (MMI), divise dallo spazio intermembrana. La MME è permeabile agli ioni e ad alcuni metaboliti grazie alla presenza di proteine canale, le porine, mentre la MMI è più selettiva. La MMI è suddivisa in due domini: la membrana delimitante interna (*inner boundary membrane, IBM*) e le creste mitocondriali, che si presentano come invaginazioni della MMI, aumentandone notevolmente l'estensione; alla base delle creste, in collegamento con la IBM, si localizzano delle strutture tubulari dette *cristae junctions* (giunzioni delle creste). Tali giunzioni giocano un ruolo chiave nel regolare il passaggio di metaboliti quali l'ADP e i protoni tra lo spazio intermembrana e all'interno delle creste. Il compartimento racchiuso dalla MMI è la matrice mitocondriale al cui interno sono presenti enzimi solubili coinvolti nell'ossidazione del piruvato, ma anche piccoli ribosomi e il DNA mitocondriale, che codifica per 13 polipeptidi mitocondriali, 2rRNA e 22tRNA. I mitocondri formano un network tubulare altamente interconnesso e ne modificano la forma e dimensioni tramite i processi di fissione e fusione mitocondriale: la fissione comporta la divisione del mitocondrio ed è mediata dalla GTPasi DRP1 (dynamin related protein 1) e dai suoi recettori quali FIS1, Mff, Mid49/51. La fissione dipendente da Drp1 prevede la traslocazione di Drp1 dal citoplasma alla MME, dove si lega ai suoi recettori e forma complessi oligomerici che circondano la membrana. Questi ultimi formano una struttura ad anello e inducono la fissione del mitocondrio con consumo di GTP. La fissione è controbilanciata dalla fusione

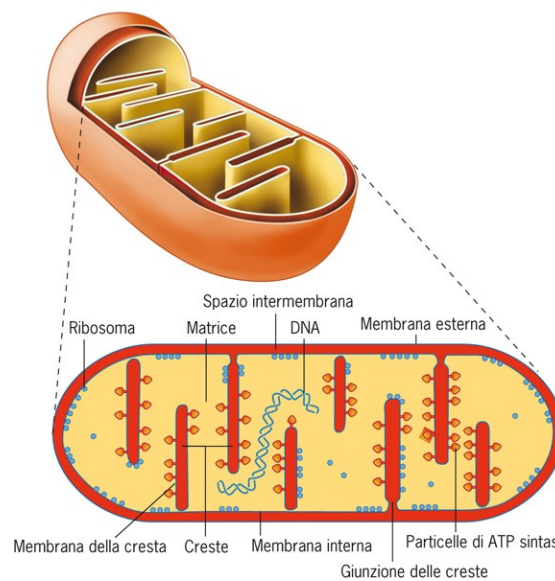


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura interna di un mitocondrio (in alto) ed una sezione longitudinale (in basso) di un mitocondrio (Karp, 2015)

mitocondriale, mediata da tre GTPasi: le mitofusine 1 e 2 (MFN1, MFN2) si localizzano sulla MME e ne mediano la fusione, mentre OPA1 è una proteina che risiede sulla MMI dove ne regola la fusione.

La principale funzione dei mitocondri è la produzione di ATP, necessaria al mantenimento della maggior parte delle attività della cellula che richiedono energia. I mitocondri hanno inoltre un ruolo importante nell'omeostasi del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ): il  $\text{Ca}^{2+}$  è un messaggero intracellulare universale i cui livelli regolano svariati processi biologici tra quali la trascrizione genica, la proliferazione cellulare o la morte cellulare programmata. La presenza di canali  $\text{Ca}^{2+}$  sulle membrane mitocondriali assicura un flusso sia in entrata che in uscita dello ione, impattando sul metabolismo e sul destino della cellula. Più precisamente, i mitocondri regolano l'apoptosi tramite il rilascio di citocromo C dall'interno delle creste mitocondriali. Questa molecola viene poi rilasciata nel citoplasma dove, tramite interazione con fattori apoptotici quali APAF1 e la procaspasi 9, dà avvio alla morte cellulare programmata.

## 1.2 L'asse PINK1-Parkin regola la mitofagia

Considerato il ruolo centrale dei mitocondri nella regolazione del metabolismo e nel destino cellulare, il mantenimento di mitocondri sani è essenziale per la fitness cellulare. In condizioni basali, la massa mitocondriale è regolata dall'equilibrio tra la loro biogenesi e degradazione, ma in caso di disfunzioni o alterazioni mitocondriali viene attivata la mitofagia. La mitofagia prevede l'eliminazione selettiva dei mitocondri disfunzionali a partire dal loro isolamento all'interno di una vescicola a doppia membrana, detta autofagosoma. Successivamente l'autofagosoma si fonde con un lisosoma, evento che comporta la degradazione idrolitica del mitocondrio. La rimozione di mitocondri danneggiati previene l'innescare della morte cellulare ed è preceduta dalla fissione mitocondriale, che facilita l'inserimento del mitocondrio nell'autofagosoma. Ai fini del riconoscimento del mitocondrio danneggiato da parte dell'autofagosoma, alcune proteine della membrana mitocondriale esterna quali TOM20, VDAC e MFN1 subiscono l'attacco covalente di catene di ubiquitina. Questo processo viene mediato da enzimi ubiquitin ligasi, quali ad esempio la proteina Parkin. Parkin agisce a valle della chinasi PINK1 all'interno di una pathway che rappresenta uno dei meccanismi di mitofagia più caratterizzati e studiati.

### 1.2.1 PINK1: struttura e funzione

PINK1 (PTEN Putative Kinase 1) è una chinasi Serina/Treonina di 64-KDa codificata dal gene PARK6 (Valente, et al., 2004). PINK1 contiene una sequenza N-terminale di targeting mitocondriale, un'elica transmembrana, un dominio chinasi Ser/Thr e un dominio C-terminale con funzione sconosciuta (Schubert, et al., 2017).

Studi condotti su *Drosophila Melanogaster* hanno evidenziato il ruolo chiave di PINK1 nel mantenimento del network mitocondriale, favorendo il reclutamento dell'ubiquitin ligasi Parkin sui mitocondri danneggiati e quindi la loro eliminazione.

PINK1 impatta anche sulla morfologia mitocondriale, promuovendo la loro frammentazione dipendente da Drp1: in condizioni di riposo, Drp1 è inibita dalla fosforilazione mediata dal complesso PKA/AKAP1. In seguito a danno mitocondriale, PINK1 favorisce il disassemblaggio del complesso PKA/AKAP1, rilasciando l'inibizione su Drp1 (Dickey & Strack, 2011) (Pryde 2016). Tale evento è intimamente correlato all'attività mitofagica di PINK1, in quanto la frammentazione dei mitocondri è un prerequisito fondamentale per la degradazione mitocondriale (Twig & Shirihai, 2011). PINK1 inoltre regola lo spostamento dei mitocondri sui microtubuli fosforilando la proteina Miro, che ancora le chinesine ai mitocondri. La fosforilazione di Miro attiva la sua degradazione da parte dei proteosomi, in maniera Parkin-dipendente. La rimozione di Miro provoca il distacco delle chinesine, impedendo il movimento del mitocondrio. (Wang, et al., 2011).

### 1.2.2 Parkin: struttura e funzione

Parkin è codificata dal gene PARK2 (Kitada, et al., 1998) ed è una E3 ubiquitin ligasi che connette la proteina target con l'ubiquitina.

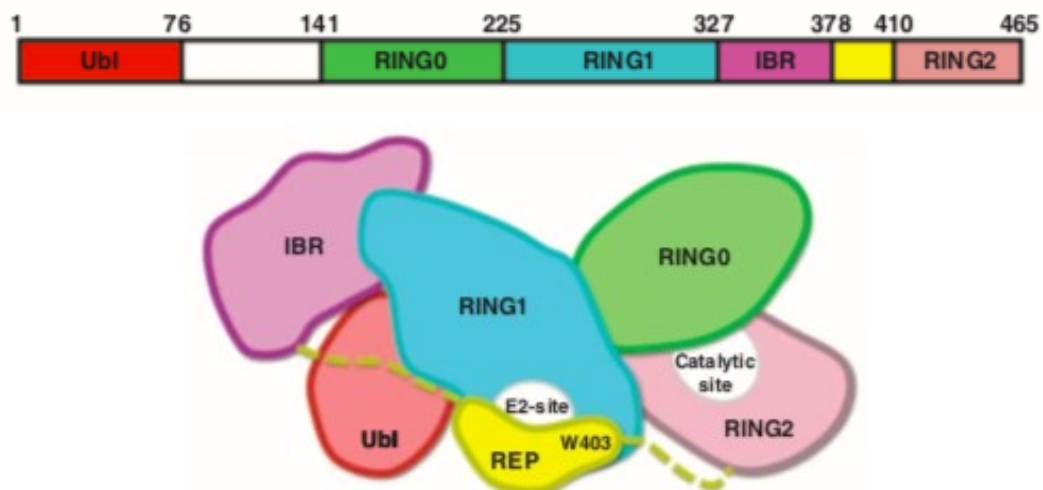


Figura 2: Rappresentazione schematica della la struttura primaria di Parkin e i suoi domini (in alto). Rappresentazione schematica della struttura quaternaria di Parkin, evidenziando il sito di legame E2 e il sito catalitico (in basso). La figura è adattata da (Trempe, et al., 2013)

L'ubiquitinazione è una modifica post-traduzionale che può fungere da segnale per la degradazione delle proteine. Una singola molecola di ubiquitina viene legata covalentemente ad un residuo di lisina o al gruppo amminico N-terminale della proteina da degradare. L'azione sequenziale degli enzimi ubiquitin ligasi induce la formazione di catene di ubiquitina e la loro forma influisce sul destino degradativo o non del substrato. Infatti Parkin può mediare sia ubiquitinazioni degradative da parte di proteosomi, o funzionali per la segnalazione intracellulare, riguardanti vari substrati situati nel citoplasma o sulla MME in seguito a depolarizzazione (Narendra, et al., 2010) (Karbowski & Youle, 2011).

Parkin è una proteina che contiene un dominio ubiquitin-like all'N-terminale (Ubl) e ring-between-ring al C terminale. Il RING0 occlude il sito accettore dell'ubiquitina (Cys<sup>431</sup>) contenuto nel RING2, mentre un repressore (REP) lega il RING1 e blocca il sito di legame E2. Ubl si dissocia da RING1 per permettere il legame con i motivi proteici che interagiscono con l'ubiquitina. La forma autoinibita è necessaria per evitare di ubiquitinare e quindi degradare i target proteici quando non richiesto. La fosforilazione di Parkin sul residuo Ser65 mediato da PINK1 (Kazlauskaitė, et al., 2014) induce un cambiamento conformazionale che attiva Parkin (Trempe, et al., 2013), il quale ubiquitina alcune proteine della MME. Tra i substrati di Parkin sulla MME si contemplano le mitofusine (MFN1 e MFN2) necessarie alla fusione fra mitocondri, il canale VDAC (Narendra, et al., 2010), MIRO1 e MIRO2 e il complesso proteico TOM, ovvero un traslocatore della MME (Chan, et al., 2011).

Più precisamente, in condizioni basali PINK1 viene trasportata costitutivamente sulla MME, tagliando la sequenza di targeting mitocondriale (Deas, et al., 2011), dove poi viene degradata tramite proteolisi voltaggio dipendente (Narendra, et al., 2010). Quando i mitocondri sono depolarizzati PINK1 non viene processata al loro interno e si accumula sulla MME (Narendra, et al., 2010) (Greene, et al., 2012). Qui PINK1 recluta Parkin, il quale ubiquitina le mitofusine e Miro (una GTPasi mitocondriale coinvolta nel movimento dei mitocondri e nella loro distribuzione cellulare) e induce l'eliminazione per autofagia dell'organello alterato (Narendra, et al., 2012).

### 1.3 Calcineurina

La Calcineurina (CaN) è una serina-treonina fosfatasi Ca<sup>2+</sup> dipendente (Crabtree, 1999). È altamente espressa nei tessuti nervosi e ha una struttura altamente conservata, dai lieviti fino agli umani. CaN è un eterodimero di 58–64-kDa, composto da una subunità catalitica (CnA) che lega la Calmodulina e da una subunità regolatoria (CnB) che lega 4 molecole di Ca<sup>2+</sup>, di cui una ad alta affinità. Studi biochimici hanno identificato la presenza di un dominio auto-inibitorio all'interno del C-terminale della subunità catalitica. In condizioni basali, l'attività enzimatica della CaN viene repressa ma a seguito dell'aumento del Ca<sup>2+</sup> citoplasmatico, tale ione si lega alla CaN e facilita il legame della Calmodulina alla CnA. Tale evento, induce la dislocazione del dominio autoinibitorio, attivando così la CaN. È dimostrato che la CaN regola la morfologia del mitocondrio, poiché defosforila la proteina pro-fissione Drp1, al residuo Ser637. Ciò induce l'attivazione e la traslocazione di Drp1 al mitocondrio, dove ne media la fissione. D'altro canto, il trattamento con ciclosporina A, inibitore della CaN, previene la frammentazione mitocondriale indotta dalla depolarizzazione (Cereghetti, et al., 2008).

La CaN gioca un ruolo chiave anche nell'autofagia: a seguito del rilascio di Ca<sup>2+</sup> da parte dei lisosomi, la CaN lega e defosforila il fattore di trascrizione TFEB. Tale evento induce la traslocazione di TFEB dal citoplasma al nucleo dove induce l'espressione dei geni coinvolti nell'autofagia e nella biogenesi dei lisosomi (Medina, et al., 2015).



## 2. SCOPO DELLO STUDIO

In base ai risultati precedentemente ottenuti in laboratorio, che hanno individuato una correlazione tra l'attività della Calcineurina (CaN) e la traslocazione di Parkin ai mitocondri, abbiamo indagato gli effetti di tale relazione sui substrati target dell'attività di ubiquitin ligasi di Parkin. Poiché PINK1 agisce upstream a Parkin, abbiamo indagato se PINK1 fosse coinvolto nell'asse CaN-Parkin. Abbiamo poi indagato l'esistenza di una potenziale interazione tra le due proteine, CaN e Parkin tramite un saggio di co-immunoprecipitazione. Infine, abbiamo condotto un'analisi *in silico* per studiare quale/i residuo/residui di Parkin potessero essere oggetto della defosforilazione mediata dalla CaN.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1. Colture cellulari**

Per questo studio, abbiamo impiegato cellule embrionali di topo MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts). Le cellule sono state tenute in coltura in terreno DMEM (Gibco) con l'aggiunta di 50 U/ml penicillina, 50 µg/ml di streptomina, 10% di siero fetale bovino (FBS), 2 mM L-glutamina e 1% di soluzione di aminoacidi non essenziali. Le cellule sono state mantenute in atmosfera controllata a 37 °C e con CO<sub>2</sub> al 5%. Per questo studio, abbiamo impiegato MEFs PINK1 knock-out (PINK1 KO) e la relativa linea wildtype come controllo (PINK1 WT). Le MEFs PINK1 KO sono state precedentemente isolate a partire da embrioni murini a 13.5 giorni post coito.

#### **3.2. Semina delle cellule e Trasfezione transiente**

Per indagare la degradazione dei substrati di Parkin a seguito dell'attivazione della CaN, abbiamo impiegato un plasmide disponibile in laboratorio che esprime una forma costitutivamente attiva della CaN, il plasmide ΔCnA. In tale mutante è stato introdotto un codone di stop in posizione 392, così da non esprimere il dominio di legame della Calmodulina nella subunità catalitica CnA. La proteina mutata risulta pertanto costitutivamente attivata. Ai fini della corretta espressione della fosfatasi, il plasmide ΔCnA è stato cotrasfettato con il plasmide per la subunità regolatoria CnB come descritto di seguito.

Le cellule sono state contate utilizzando lo strumento Luna Cell Counter (GenScript) e 200'000 cellule sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti. Il giorno seguente sono state preparate le mix di trasfezione: una per il controllo con l'empty vector (pDCR) e una con la forma costitutivamente attiva di CaN (ΔCnA+CnB). Per ogni condizione, abbiamo impiegato 2 µg di DNA risospesi in 200 µl di OptiMEM (Thermo Fisher Scientific). In parallelo, 8 µl di PEI 1 mg/ml (PolyScience) sono stati aggiunti a 200 µl di Optimem. Le due soluzioni sono state successivamente unite e incubate a temperatura ambiente per 20 minuti, al termine dei quali, sono state aliquotate nei rispettivi pozzetti.

#### **3.3. Estrazione del DNA plasmidico (Midi-Prep)**

Ai fini dell'amplificazione del DNA plasmidico pDCR, vettore di controllo per il mutante della CaN, abbiamo eseguito una Midi-Prep. Il vettore è stato precedentemente usato per trasformare batteri E. Coli competenti e congelati in glicerolo 25% a -80 °C.

Per l'inoculo della coltura batterica, sono stati usati 200 ml di terreno LB e incubato per 16 h a 37 °C, in costante agitazione (300 rpm). Dopo averne misurato l'assorbanza (OD<sub>600</sub>), i batteri sono stati pellettati per 10 minuti a 6'000 g a 4 °C. L'estrazione del DNA plasmidico è stata eseguita tramite il kit NucleoBond® Xtra

Midi (Machery-Nagel). È stato seguito il protocollo “Low copy plasmid purification (Midi)”. Il pellet è stato risospeso in 16 ml del Buffer di risospensione RES + RNase A. Si è aggiunto 16 ml di buffer di lisi (LYS), invertendo la falcon per 5 volte e incubandola a temperatura ambiente per 5 minuti. Sulla NucleoBond® Xtra Column è stato posizionato il filtro e sui margini di quest’ultimo è stato applicato il buffer EQU (12 ml). Alla sospensione è stato aggiunto il buffer NEU (16 ml), miscelandolo sempre invertendo la falcon finché il composto non diventa incolore. Il lisato è stato quindi versato un po’ alla volta nel filtro e lasciato scendere per gravità. Il filtro è stato equilibrato con 5 ml di buffer EQU che poi è stato rimosso; successivamente si sono aggiunti 8 ml di buffer WASH alla colonna, in modo da lavare il DNA. Il DNA plasmidico è stato quindi eluito con 5 ml di buffer ELU ed è poi stato aggiunto isopropanolo (3.5 ml) a temperatura ambiente per precipitare il DNA. La falcon è stata centrifugata per 30 minuti a 4 °C a 15000 g per eliminare il surnatante, dopodiché 2 ml di etanolo al 70% sono stati aggiunti al pellet, ricentrifugandolo per 5 minuti a 15000. È stato nuovamente rimosso il surnatante e il pellet è stato lasciato asciugare. Infine è stato risospeso in acqua e ne è stata valutata la concentrazione tramite lettura al nanodrop.

### **3.4. Estrazione proteica**

Dopo 48 ore dalla trasfezione delle MEFs, il terreno è stato rimosso ed è stato seguito un lavaggio in PBS a 4 °C (1 ml per well). Le cellule sono state staccate dalle well con uno scraper e raccolte nuovamente in PBS (1 ml), aliquotandole nelle eppendorf. Le cellule sono state centrifugate per 5 minuti a 4 °C, a 3000 g. È stato eliminato il surnatante e aggiunto il buffer di lisi. Come buffer di lisi è stato utilizzato il RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,5% Sodio deossicolato, 1% NP-40, 0,1% SDS) e inibitori di proteasi e fosfatasi aggiunti a fresco. I lisati sono stati incubati in ghiaccio per 30 minuti, vortexandoli ogni 5-10 minuti. Al termine dell’incubazione, sono stati centrifugati a 20’000 g per 15 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato quindi aliquotato in nuove eppendorf e quantificato tramite Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Per ogni condizione, sono stati caricati 40 µg di proteina in gel ExpressPlus™ PAGE gels (GenScript) 4-20%, con voltaggio pari a 110 V. Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite tramite metodo Semi-Dry (Bio-RAD) sulla membrana PVDF (Millipore), applicando un voltaggio di 25 V per 30 min. Per minimizzare potenziali segnali aspecifici, la membrana è stata incubata con una soluzione di bloccaggio composta da latte al 5% in TBS-T 0,05%. Infine, la membrana è stata tagliata ai pesi molecolari di interesse ed ogni porzione incubata per 16 ore a 4 °C con il rispettivo anticorpo. In particolare, sono stati usati i seguenti anticorpi: MFN1 (Protein Tech 1:500), VDAC (Abcam 1:1000), TOM20 (Santa Cruz 1:2000), Vinculina (Sigma-Aldrich, 1:2000), Parkin (Santa Cruz, 1:500), Parkin Ser131 (St John’s Laboratory, 1:500), Calcineurin (Abcam, 1:1000). Il giorno dopo sono stati eseguiti 3 lavaggi da 10 minuti con tbs-t 0,05%, poi è stato incubato con l’anticorpo secondario (1:1000) per un’ora e infine sono stati nuovamente effettuati 3 lavaggi con tbs-t 0,05%. Le immagini sono state acquisite

tramite ImageQuant LAS4000 e analizzate con il software ImageJ per l'analisi densitometrica.

### 3.5. Co-immunoprecipitazione

15 piastre da 10 cm sono state trattate con 10  $\mu$ M CCCP risospeso in DMSO e altre 15 con eguale volume di DMSO, per 2 ore. Le cellule sono state raccolte in falcon da 50 ml e centrifugate per 5 minuti a 200 g. Il pellet è stato risospeso in 2 ml di PBS a 4 °C e aliquotato in falcon da 15 ml. È stato nuovamente centrifugato a 200 g per 5 minuti. Le cellule sono state incubate in ghiaccio per mezz'ora (pipettando delicatamente ogni 5 minuti) con il buffer di lisi (Hepes 50 mM, Glicerolo 10%, Triton X-100 1%, Tween-20 0.1%, PIC 2x, inibitore di fosfatasi 1x, H<sub>2</sub>O, pH 7.2). In parallelo, sono state lavate 50  $\mu$ l di beads d'agarosio di proteina A (Roche) in 1 ml di PBS a 4 °C, centrifugando per 30 secondi a 300 g, prima di rimuovere la soluzione di lavaggio. L'operazione è stata ripetuta nuovamente con il PBS e una terza volta con il buffer di lisi. Al termine della lisi, i lisati cellulari sono stati centrifugati a 12'000 g per 15 minuti a 4 °C e il surnatante è stato incubato con le beads di agarosio precedentemente preparate. Questa fase viene detta *preclearing* e ha lo scopo di ridurre l'eventuale legame aspecifico di proteine alle beads usate successivamente per il pulldown. Il complesso lisato-beads del preclearing è stato incubato per 30 minuti a 4 °C, con una rotazione di 10 rpm. La concentrazione proteica è stata stimata tramite BCA (Thermo Fisher Scientific). Per ogni condizione, sono stati prelevati 100  $\mu$ g di proteina (corrispondente alla frazione dell'input) mentre il restante lisato è stato diviso in due parti: una frazione è stata incubata con 2  $\mu$ g di anticorpo Parkin (Santa Cruz SC-322282), mentre la seconda con 2  $\mu$ g di anticorpo IgG (Santa Cruz SC-2025). I complessi lisato-anticorpo sono stati incubati per 16 h a 4 °C con rotazione di 10 rpm. Il giorno seguente sono state lavati 75  $\mu$ l di beads allo stesso modo del giorno precedente e poi incubate per 1 ora con il lisato a 4 °C (rotazione a 10 rpm), dopodiché sono state centrifugate per 30 secondi a 4 °C a 300 g. A seguito della rimozione del surnatante, si sono eseguiti 3 lavaggi con 1 ml di PBS a 4 °C. Ai fini di eluire le proteine, sono stati aggiunti 70  $\mu$ l di Laemmli 2X alle beads e incubate a 70 °C per 10 minuti (750 rpm).

## 4. RISULTATI

### 4.1. La Calcineurina regola la traslocazione di Parkin ai mitocondri indipendentemente da PINK1

Nonostante nell'ultima decade la pathway PINK1-Parkin sia stata ampiamente studiata, parte del meccanismo molecolare non è stato completamente elucidato. Uno dei quesiti aperti è relativo agli stimoli fisiologici che promuovono la traslocazione di Parkin ai mitocondri disfunzionali. Disaccoppianti mitocondriali quali il CCCP (Carbonil cianuro m-clorofenil idrazone) che dissipa il gradiente protonico aumentando la permeabilità dei protoni attraverso la MMI, induce l'attivazione e traslocazione di Parkin sul mitocondrio danneggiato. Considerato che il trattamento con CCCP induce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico (Pereira 2008), studi precedentemente condotti nel nostro laboratorio hanno indagato la potenziale correlazione tra i livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  e la traslocazione di Parkin ai mitocondri. Ne è risultato che tale evento è mediato dall'aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico conseguente al trattamento con CCCP (dato non mostrato). Il  $\text{Ca}^{2+}$  funge da messaggero chiave nella regolazione del metabolismo cellulare, nonché nel modulare l'attività di enzimi che a loro volta impattano sulla localizzazione subcellulare della proteina target, sulla sua conformazione o sulle interazioni con i propri partner. Ad esempio il  $\text{Ca}^{2+}$  rilasciato dai lisosomi attiva la fosfatasi Calcineurina (CaN), la quale induce la traslocazione del suo substrato TFEB, un fattore di trascrizione chiave per regolare l'autofagia e la biogenesi degli organelli, al nucleo. L'espressione di un mutante costitutivamente attivo della CaN ( $\Delta\text{CaN}$ ) ha dimostrato che tale proteina era non solo necessaria, ma sufficiente, alla traslocazione di TFEB nel nucleo (Medina, et al., 2015). Tale evento comporta la trascrizione di geni autofagici, target dell'attività trascrizionale di TFEB, e conseguentemente all'autofagia. In aggiunta, l'attivazione della CaN, associata a livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico elevati, media la defosforilazione e traslocazione ai mitocondri della pro fission dynamin related protein 1 (Drp1), la quale ne media la frammentazione (Cereghetti, et al., 2008).

Considerato il ruolo centrale della CaN sia nell'autofagia che nella fissione mitocondriale, due eventi concomitanti e sinergici nel processo autofagico, nel nostro laboratorio si è indagata una potenziale correlazione tra l'attività della fosfatasi CaN e della proteina Parkin. Tali esperimenti sono stati condotti usando fibroblasti murini (MEFs) i quali non esprimono Parkin a livello endogeno. È stato quindi overspresso in transiente il plasmide Parkin-Cherry in parallelo con il plasmide mitoYFP per visualizzare i mitocondri. In condizioni basali Parkin presenta una distribuzione citoplasmatica e i mitocondri formano il caratteristico network mitocondriale altamente interconnesso (Fig. 3). Il trattamento in CCCP induce la frammentazione dei mitocondri, nonché la ridistribuzione di Parkin, il quale viene visualizzato come *puncta* che in parte colocalizzano con i mitocondri, dimostrando il suo reclutamento ai mitocondri. Sorprendentemente, nelle cellule in cui è stato espresso il plasmide  $\Delta\text{CaN}$  l'attivazione della CaN induce un aumento significativo della traslocazione di Parkin ai mitocondri rispetto al relativo controllo

EV (empty vector), anche in assenza dello stimolo di CCCP (Fig. 3). Ciò dimostra che la CaN regola la traslocazione di Parkin ai mitocondri.

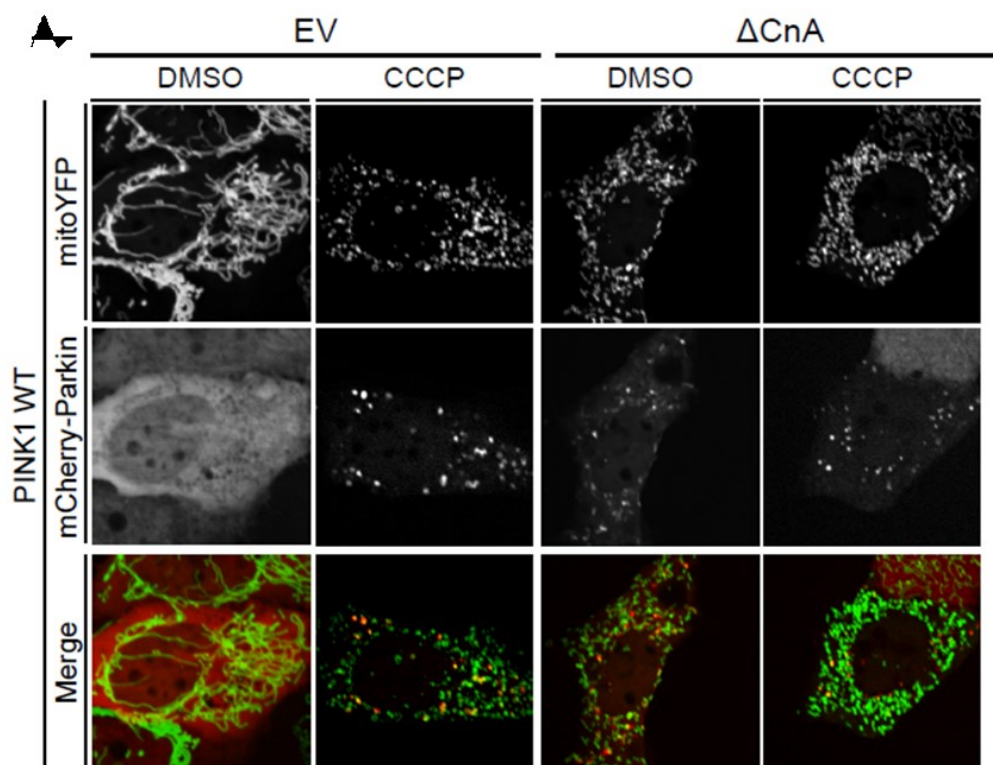


Figura 3: MEFs wildtype trasfettate con ParkinCherry e mitoYFP. In condizioni basali, Parkin presenta una distribuzione citoplasmatica. A seguito del trattamento con CCCP, Parkin si aggrega a formare dei puncta, parte dei quali colocalizzano con il network mitocondriale frammentato. L'espressione del mutante costitutivamente attivo della CaN ( $\Delta$ CnA) fenocopia tale condizione anche in assenza dello stimolo del CCCP.

Dato il ruolo cardine della chinasi PINK1 nel regolare la traslocazione di Parkin ai mitocondri, l'analisi di traslocazione è stata estesa anche in cellule MEFs PINK1 KO. In tale modello, l'assenza di PINK1 ostacola la traslocazione di Parkin a seguito del trattamento con il disaccoppiante, in quanto seppur i mitocondri risultino più frammentati rispetto al controllo, Parkin mantiene la sua distribuzione citoplasmatica (Fig. 4). PINK1 è quindi necessario al reclutamento di Parkin, in accordo con quanto descritto in letteratura. Tuttavia, è interessante notare che l'attivazione della  $\Delta$ CnA reverte tale fenotipo, inducendo la traslocazione anche in condizioni basali, ossia senza lo stimolo del CCCP (Fig. 4) Ciò ha dato ancora più rilevanza al ruolo della CaN nel regolare la traslocazione di Parkin ai mitocondri poiché tale evento è indipendente da PINK1. Considerato che mutazioni in PINK1 comportano alterazioni nella funzionalità dei mitocondri, la CaN potrebbe rappresentare un enzima chiave in un contesto di mitofagia alterata.

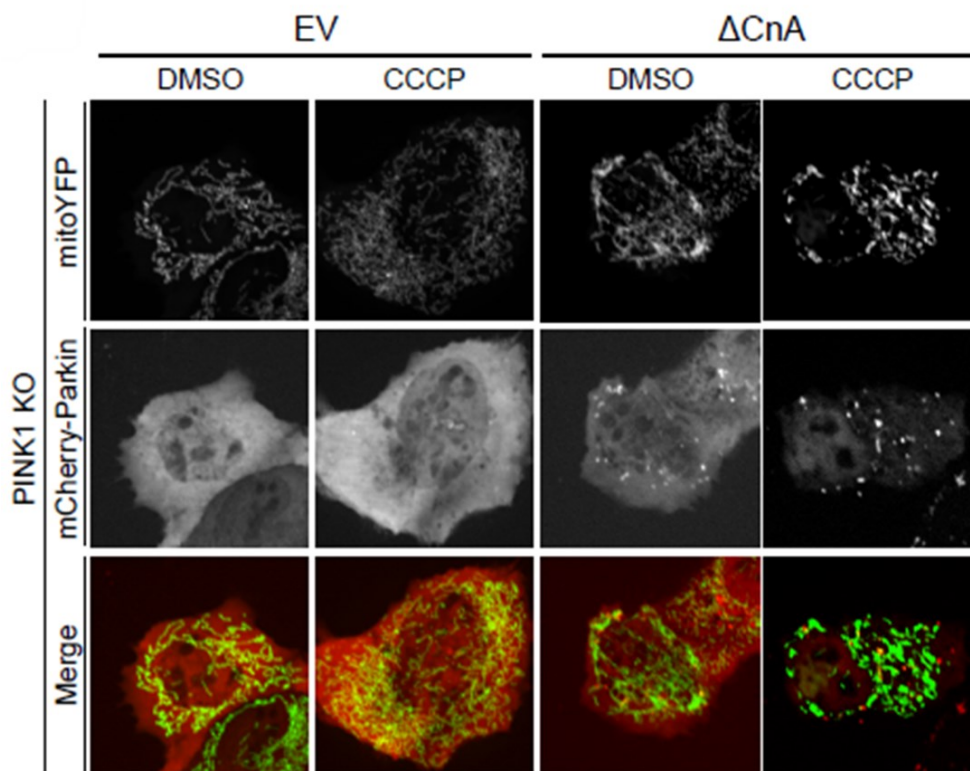


Figura 4: MEFs PINK1 Knockout trasfettate con ParkinCherry e mitoYFP. In condizioni basali, Parkin presenta una distribuzione citoplasmatica. A seguito del trattamento con CCCP, Parkin mantiene la sua distribuzione citoplasmatica. L'espressione del mutante costitutivamente attivo della CaN ( $\Delta$ CnA) fenocopia tale condizione anche in assenza dello stimolo del CCCP e di PINK1.

#### 4.2. L'attivazione della CaN influenza i livelli proteici dei target mitocondriali di Parkin

I risultati precedenti dimostrano che l'attivazione della CaN impatta sulla traslocazione di Parkin, la quale media l'ubiquitinazione di proteine residenti sulla superficie mitocondriale. Più precisamente, a seguito dell'attivazione di Parkin i livelli basali delle sue proteine target quali MFN1, VDAC e TOM20 diminuiscono significativamente (Glaser, et al., 2011), (Geisler, et al., 2010), (Yoshii, et al., 2011). Per investigare l'effetto della CaN sull'attività di Parkin abbiamo quindi analizzato i livelli proteici di MFN1, VDAC e TOM20.

Per verificare se l'effetto dell'attivazione della CaN sia mediato da Parkin, abbiamo impiegato MEFs con espressione stabile di Parkin-Flag (MEFs Parkin-Flag) e la rispettiva linea di controllo (MEFs PMSCV) in cui Parkin non è espresso. In entrambe le linee, l'attivazione della CaN è stata riprodotta tramite espressione in transiente del mutante CaN costitutivamente attivo ( $\Delta$ CnA) e relativo controllo (EV).

La prima proteina analizzata è stata MFN1 (Fig. 5). Dall'analisi densitometrica non sono emerse differenze significative tra le condizioni analizzate. Questo risultato potrebbe essere legato alla ridotta numerosità campionaria (l'esperimento è stato infatti condotto su tre replicati biologici). Inoltre, potrebbe essere necessario ottimizzare le condizioni sperimentali di trasfezione. Tuttavia, si osserva un trend

che suggerisce una sensibile diminuzione dei livelli di MFN1 a seguito dell'attivazione della CaN, sia in condizioni in cui Parkin non è sovraespresso (MEFs PMSCV) che di overespressione di Parkin (MEFs Parkin-Flag) (Fig. 5B). E' da considerare che altre ubiquitin ligasi (quale ad esempio MUI1) agiscono in parallelo a Parkin nell'ubiquitinare MFN1 (Yun, et al., 2014). Poiché MFN1 non è target esclusivo dell'attività ubiquitin-ligasica di Parkin, non possiamo escludere che l'attivazione della CaN induca l'attivazione di altre ubiquitin ligasi. Ciò giustificerebbe un'eventuale differenza nei livelli di MFN1 in condizioni di assenza di Parkin. In condizioni di Parkin overespresso si osserva un trend che suggerisce una diminuzione dei livelli di MFN1 rispetto al controllo, in linea con quanto atteso (Fig. 5B). L'espressione del mutante  $\Delta$ CnA abbassa ulteriormente tale valore ma ulteriori replicati saranno necessari per consolidare tale evidenza.

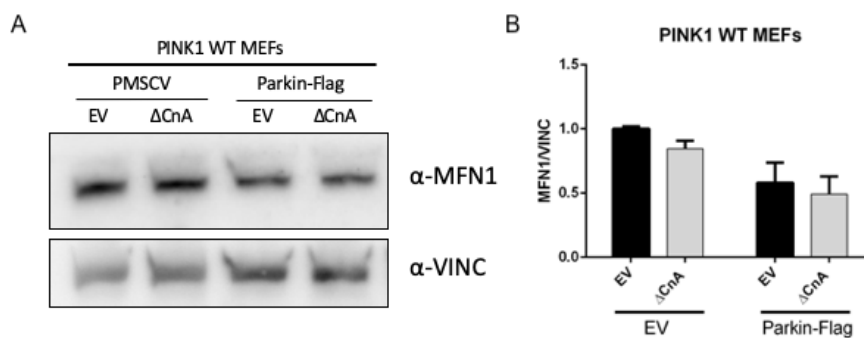


Figura 5: A) Western blot rappresentativo in PINK1 WT MEFs dei livelli proteici di MNF1. Come loading control è stata usata la proteina del citoscheletro vinculina ( $\alpha$ -VINC). B) Il grafico a barre mostra la quantificazione dell'analisi densitometrica condotta su 3 replicati biologici, in cui le barre di errore indicano lo standard error of the mean. Analisi statistica attuata con il programma Prism; test n=3 Two-way Anova.

Per quanto riguarda VDAC, l'overespressione di Parkin induce una differenza significativa nei livelli basali della proteina (Fig.6). Tuttavia, l'attivazione della CaN non abbassa significativamente tali valori in questo background, seppur anche in questo caso, si osservi un trend analogo a quello della MFN1. Confrontando invece l'effetto dell'attivazione della CaN nei due background cellulari, si registra una significativa diminuzione dei livelli basali di VDAC quando Parkin è overespresso, rispetto alla linea di controllo. Ulteriori replicati sono richiesti per corroborare il dato ma questa evidenza suggerisce che l'attività della CaN possa effettivamente essere mediata da Parkin.



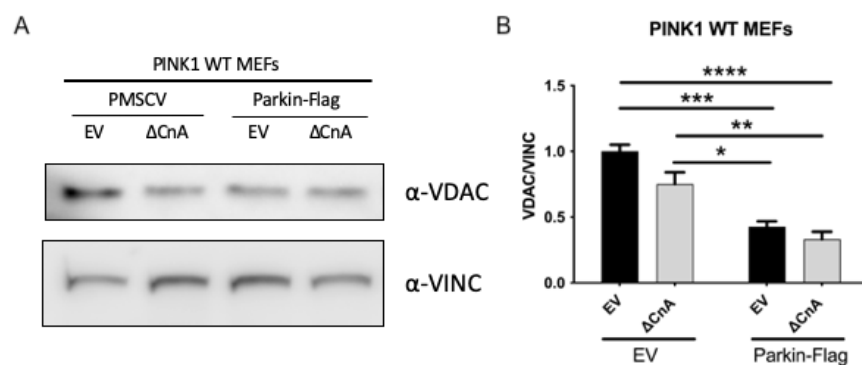


Figura 6: A) Western blot rappresentativo in PINK1 WT MEFs dei livelli proteici di VDAC. Come loading control è stata impiegata la proteina Vinculina ( $\alpha$ -VINC). B) Il grafico a barre mostra la quantificazione dell'analisi densitometrica condotta su 4 replicati biologici, in cui le barre di errore indicano lo standard error of the mean. Analisi statistica attuata con il programma Prism; test n=4 Two-way Anova.

L'analisi dei blot per TOM20 non hanno riportato differenze significative a seguito dell'espressione del mutante  $\Delta$ CnA nelle MEFs Parkin-Flag, anche se ancora una volta, si osserva un trend che suggerisce una riduzione dei livelli basali di TOM20. Analogamente a quanto riscontrato per VDAC, si è registrato un decremento significativo quando la CaN è attiva in MEFs Parkin-Flag rispetto alle MEFs in cui Parkin non è espresso (Fig. 7).

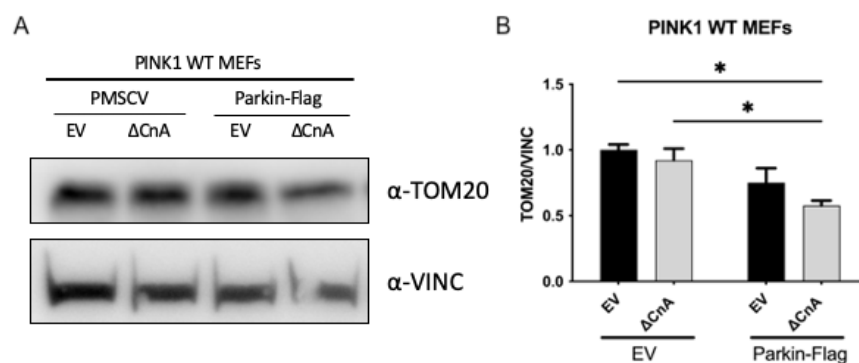


Figura 7: A) Western blot rappresentativo in PINK1 WT MEFs dei livelli proteici di TOM20. Come loading control è stata usata la proteina Vinculina ( $\alpha$ -VINC). B) Il grafico a barre mostra la quantificazione dell'analisi densitometrica condotta su 3 replicati biologici, in cui le barre di errore indicano lo standard error of the mean. Analisi statistica attuata con il programma Prism; test n=3 Two-way Anova.

Considerato il ruolo della chinasi PINK1 nel modulare l'attività di Parkin, abbiamo poi investigato l'impatto dell'attivazione della CaN in un modello di MEFs PINK1 KO. Come nelle analisi precedenti, abbiamo impiegato come readout dell'attività di Parkin i livelli basali delle proteine target MFN1, VDAC e TOM20.

L'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa nei livelli di MFN1 nelle cellule Parkin-Flag esprimenti la CaN attiva rispetto alle MEFs PMSCV. Tuttavia, non si è riscontrata alcuna differenza in MEFs Parkin-Flag tra l'espressione del mutante  $\Delta$ CnA e il rispettivo EV. Ciò potrebbe essere legato ancora una volta all'efficienza di espressione del mutante impiegato, parametro che deve essere verificato in futuri esperimenti.

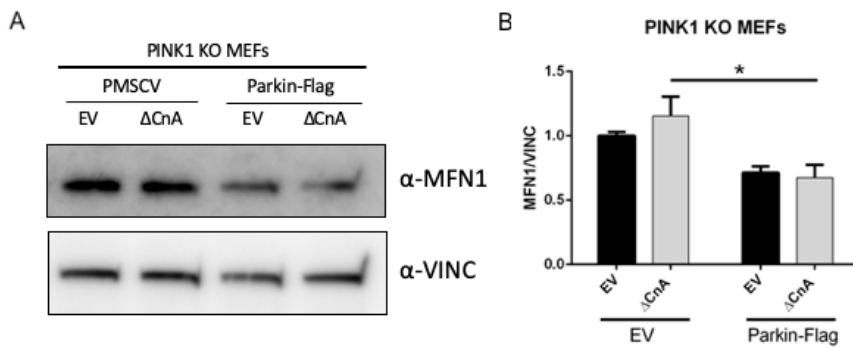


Figura 8: A) Western blot rappresentativo in PINK1 KO MEFs dei livelli proteici di MFN1. Come loading control è stata impiegata la proteina Vinculina ( $\alpha$ -VINC). B) Il grafico a barre mostra la quantificazione dell'analisi densitometrica condotta su 3 replicati biologici, in cui le barre di errore indicano lo standard error of the mean. Analisi statistica attuata con il programma Prism; test  $n=3$  Two-way Anova.

Anche nel caso dei livelli proteici di VDAC, non abbiamo osservato differenze significative tra l'espressione del mutante  $\Delta$ CnA e il relativo controllo in MEFs Parkin-Flag, anche se si è osservato un trend che suggerisce una sensibile diminuzione (Fig. 9). E' interessante notare che, diversamente dal caso delle MEFs PINK1 WT, in condizioni di assenza di PINK1 l'attivazione della CaN non sembra impattare minimamente sui livelli basali di VDAC quando anche Parkin è assente nel sistema.

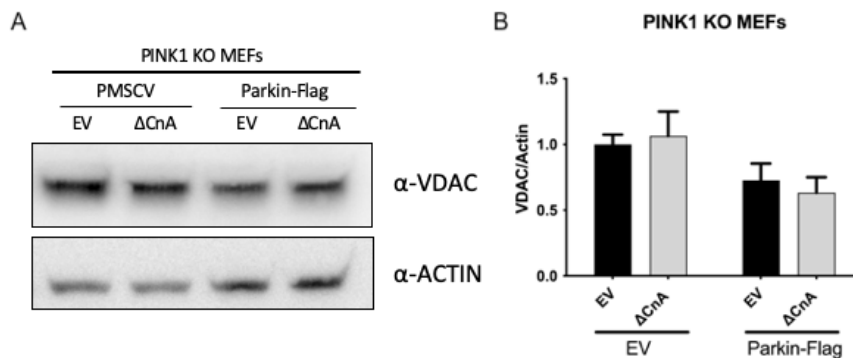


Figura 9: A) Western blot rappresentativo in PINK1 KO MEFs dei livelli proteici di VDAC. Come loading control in questo caso è stata impiegata la proteina citoscheletrica Actina ( $\alpha$ -Actina). B) Il grafico a barre mostra la quantificazione dell'analisi densitometrica condotta su 4 replicati biologici, in cui le barre di errore indicano lo standard error of the mean. Analisi statistica attuata con il programma Prism; test  $n=4$  Two-way Anova.

L'analisi densitometrica di TOM20 condotta su tre replicati biologici ha rilevato una profonda variabilità tra i campioni analizzati (Fig. 10) e non evidenzia alcuna differenza significativa tra le condizioni analizzate.

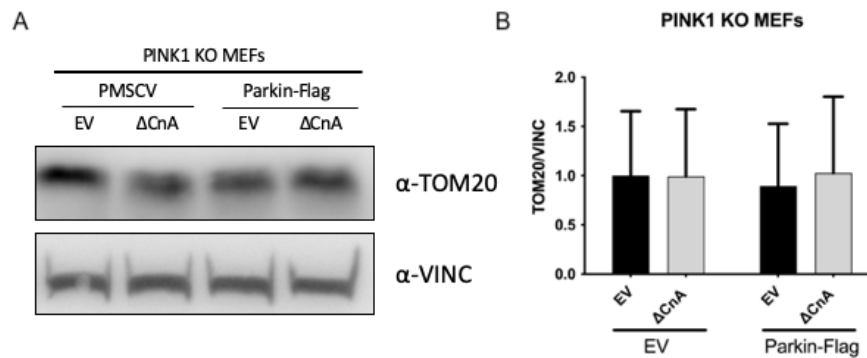


Figura 10: A) Western blot rappresentativo in PINK1 KO MEFs dei livelli proteici di TOM20. Come loading control è stata impiegata la proteina Vinculina ( $\alpha$ -VINC) B) Il grafico a barre mostra la quantificazione dell'analisi densitometrica condotta su 3 replicati biologici, in cui le barre di errore indicano lo standard error of the mean. Analisi statistica attuata con il programma Prism; test n=3 Two-way Anova.

### 4.3. La Calcineurina interagisce con Parkin a seguito del trattamento con CCCP

Studi precedentemente condotti in laboratorio hanno approfondito l'analisi dell'impatto dell'attivazione della CaN sull'attività di Parkin, dimostrando che tale evento comporta un aumento della mitofagia Parkin-dipendente e un cambiamento conformazionale della proteina. Alla luce di tali evidenze, si è investigata la potenziale interazione fra le due proteine tramite co-immunoprecipitazione. L'esperimento è stato condotto in cellule HEK293 in cui Parkin viene espresso a livello endogeno. In precedenza, tale modello è stato usato per rilevare l'interazione tra le due proteine a livello fisiologico, tuttavia senza alcun riscontro positivo. Ai fini di stimolare la potenziale interazione, abbiamo pretrattato le cellule con CCCP, stimolo che induce un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico il quale è essenziale per l'attivazione della CaN endogena.

Poiché Parkin ha un peso molecolare di 50 kDa, equivalente alle catene pesanti dell'anticorpo usato per il suo pulldown, abbiamo usato in parallelo un anticorpo di controllo IgG.

Dalla membrana in Fig. 11 si può vedere come l'anticorpo anti-Parkin abbia detectato l'arricchimento della proteina sia in condizioni basali (DMSO), sia in cellule trattate con CCCP. Tuttavia, il segnale della CaN è stato rilevato solo in condizioni di trattamento con CCCP, dimostrando che è necessario uno stimolo per rilevare l'interazione delle due proteine.

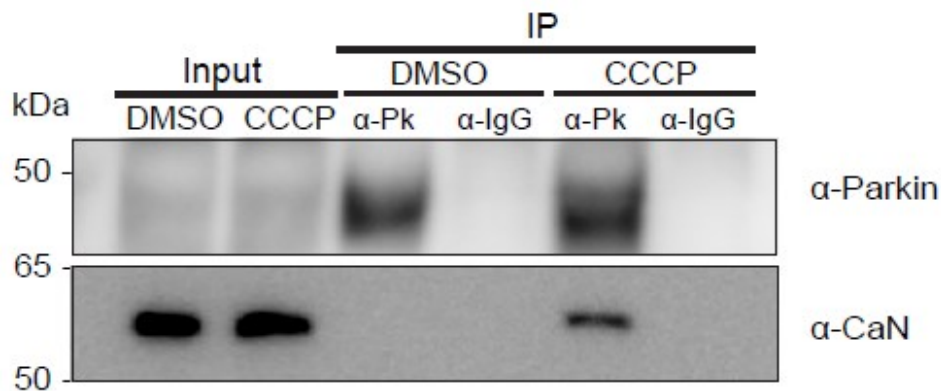


Figura 11: Esperimento di co-immunoprecipitazione di Parkin per la ricerca dell'interazione fra Parkin e Calcineurina. Nell'input è stata caricata una frazione di lisato corrispondente ad 1:100 del pulldown.

#### 4.4. Indagine del residuo target della Calcineurina su Parkin

Stabilita l'esistenza di un'interazione fisica fra Parkin e Calcineurina, abbiamo deciso di investigare quale potesse essere il residuo di Parkin coinvolto nella defosforilazione mediata dalla CaN.

Poiché le nostre evidenze sperimentali suggeriscono che la defosforilazione mediata dalla CaN induca l'attivazione di Parkin, abbiamo dedotto che la fosforilazione nel medesimo sito comporti la sua inattivazione. Assumendo inoltre che le due proteine interagiscano direttamente, i residui di Tirosina sono da escludere in quanto la CaN esercita la sua azione su residui di Serina e Treonina. Partendo quindi da questo ragionamento, abbiamo effettuato un'indagine bibliografica per ricercare residui precedentemente descritti in letteratura che potessero soddisfare tale requisito. Allo stato attuale sono descritti solamente due residui che inattivano Parkin a seguito di fosforilazione: Tyr143 (Ko, et al., 2010) e Ser131, dove la chinasi Dyrk1A fosforila direttamente Parkin (Im & Chung, 2015). Poiché la CaN è una fosfatasi Serin/Treonina e in linea con l'ipotesi che la defosforilazione non abbia proteine intermedie, è da escludere a priori il residuo Tyr143.

In parallelo è stata eseguita un'indagine delle sequenze consenso descritte per la CaN, per indagare l'eventuale presenza di una di esse nella sequenza amminoacidica di Parkin. Le sequenze consenso sono sequenze amminoacidiche adiacenti al sito o ai siti di fosforilazione da parte di una proteina chinasi, che siano considerate essenziali per il loro riconoscimento e fosforilazione da parte di quella chinasi. Generalmente sono brevi sequenze lineari che indicano l'identità di alcuni amminoacidi che comprendono tale sito e la posizione relativa al sito di fosforilazione. Per la CaN sono state individuate quattro sequenze consenso elencate in Tabella 1.

Sequenza consenso della CaN	Referenza in letteratura
PxlxIT	Li, H., Zhang, L., Rao, A., Harrison, S. C., & Hogan, P. G. (2007). Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. <i>Journal of molecular biology</i> , 369(5), 1296–1306.
LxVP	Sheftic, S. R., Page, R., & Peti, W. (2016). Investigating the human Calcineurin Interaction Network using the $\pi\phi$ LxVP SLiM. <i>Scientific reports</i> , 6, 38920.
SPPASPP VIVIT	Vega, R. B., Yang, J., Rothermel, B. A., Bassel-Duby, R., & Williams, R. S. (2002). Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. <i>The Journal of biological chemistry</i> , 277(33), 30401–30407.

Tabella 1: Tabella di riepilogo delle sequenze consenso della CaN descritte in letteratura

Dal database Uniprot abbiamo ricavato la sequenza amminoacidica della proteina Parkin umana (Fig. 12) e ricercato l'esistenza di una sequenza che richiamasse una o più sequenze consenso descritte per la CaN. Non si è identificato un esatto match tra tali sequenze con Parkin, tuttavia abbiamo riscontrato la presenza della sequenza SPPAGSPA, la quale è simile alla sequenza consenso SPPASPP (Fig.6, evidenziata in giallo). È interessante notare che la prima Serina di tale sequenza coincida con la Ser131, residuo che è stato precedentemente descritto come target di una "fosforilazione inibitoria" per Parkin.

```
>sp|O60260|PRKN_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase parkin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKN PE=1 SV=2
MIVFVRFNSSHGFPVEVSDTSIFQLKEVVAKRQGV PADQLRVIFAGKELRNDWTVQN
CDLDQQSIVHIVQRPWRKGQEMNATGGDDPRNAAGGCEREPQSLTRVDLSSSVLPG
DSVGLAVILHTDSRKD SPPAGSPAGRSIYNSFYVYCKGPCQRVQPGKLRVQCSTCRQA
TLTLTQGPSCWDDVLIPNRMSGECQSPHCPGTSAEFFFKCGAHP TSDKETSVALHLIAT
NSRNITCITCTDVRSPVLV FQCNSRHHVICLDCFHLYCVTRLNDRQFVHDPQLGYSLPCVA
GCPNSLIKELHHFRILGEEQYNRYQQYGAE ECVLQMGGVLCPRPGCGAGLLPEPDQRK
VTCEGGNGLGCGFAFCRECKEAYHEGECSAVFEASGTTTQAYRVD ERAAEQARWEAA
SKETIKKTTKPCPRCHVPVEKNGGCMHMKCPQPQCRLEWCWNCGCEWNRVCMGD
HWFVDV
```

Figura 12: Sequenza della proteina Parkin umana. Evidenziata in giallo la sequenza d'interesse contenente il residuo Ser131

La presenza di una Glicina in più nella sequenza di Parkin potrebbe impattare relativamente in virtù del suo ridotto ingombro sterico laterale. Un'altra differenza riguarda la sostituzione della Prolina con l'Alanina verso il C-terminale della sequenza.

Nonostante la struttura di Parkin sia stata cristallografata, rimane tutt'ora ignota una porzione di 70 amminoacidi in cui rientra proprio la sequenza SPPAGSPA. Abbiamo quindi sfruttato il software AlphaFold che permette di predire la struttura tridimensionale di una proteina. La predizione ha rilevato che la sequenza

d'interesse cade in un loop, una struttura estremamente flessibile, adatta ai cambiamenti conformazionali delle proteine.

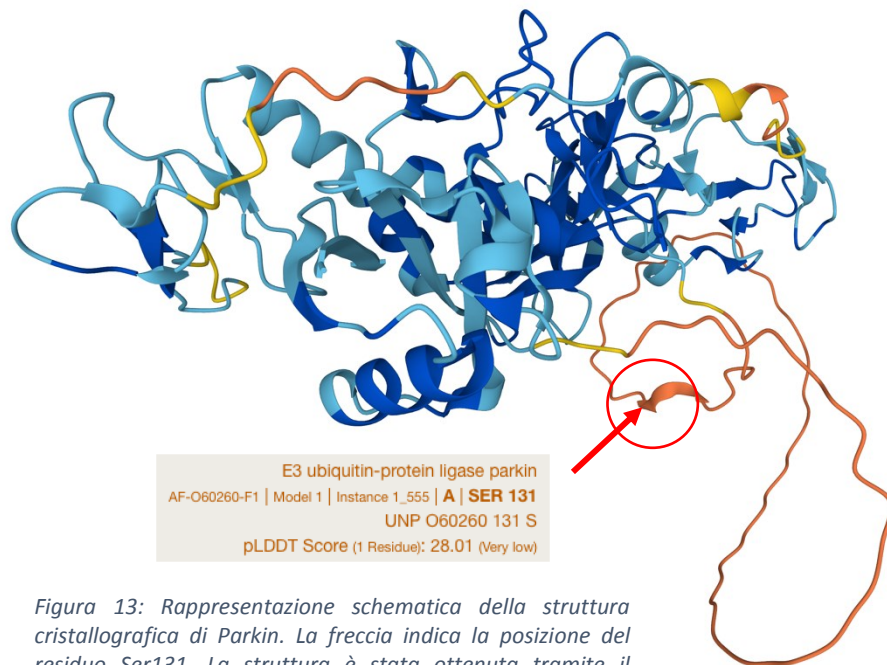


Figura 13: Rappresentazione schematica della struttura cristallografica di Parkin. La freccia indica la posizione del residuo Ser131. La struttura è stata ottenuta tramite il software AlphaFold.

Sulla base di tali prove circostanziali, abbiamo deciso di studiare il residuo Parkin Ser131 quale possibile target della CaN, avvalendoci di un anticorpo specifico per Parkin fosforilato in tale Serina.

Abbiamo eseguito un esperimento preliminare su cellule HEK293 i cui livelli endogeni di Parkin sono detectabili tramite Western Blot. Ci siamo avvalsi dell'espressione del mutante costitutivamente attivo della CaN,  $\Delta$ CnA, per indurre l'attivazione della fosfatasi e il corrispettivo vettore vuoto (EV) come controllo (Fig.14). Purtroppo, l'esperimento non ha portato da un risultato conclusivo, in quanto abbiamo ottenuto un pattern di bande che rende difficoltosa l'identificazione della corretta banda per Parkin. Al di là di includere dei controlli negativi e positivi, abbiamo preso in esame la strategia futura di ripetere l'esperimento in condizione di overespressione di Parkin, ai fini di facilitare il riconoscimento della proteina.



## 5. DISCUSSIONE

I mitocondri sono organelli cellulari essenziali per il metabolismo energetico e l'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$ . La loro elevata dinamicità è legata ai continui cicli di fusione e fissione a cui sono sottoposti, oltre alla mobilità all'interno della cellula. Dato il ruolo chiave dei mitocondri, il mantenimento dell'integrità e del funzionamento del network mitocondriale è essenziale per la fitness cellulare. La cellula ha quindi sviluppato sofisticati meccanismi che mediano la rimozione dei mitocondri danneggiati, in quanto fonte di segnali di danno cellulare (come ad esempio le specie reattive dell'ossigeno). Il meccanismo di rimozione selettiva dei mitocondri alterati prende il nome di mitofagia, in cui l'asse PINK1-Parkin rappresenta una delle pathway più studiate e rilevanti.

PINK1, una serina-treonina chinasi codificata dal gene PARK6 (Valente, et al., 2004) e gioca un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi mitocondriale. È stato dimostrato che la sua assenza è correlata ad alterazioni mitocondriali, quali la riduzione o la perdita della polarità di membrana, disfunzioni nella fosforilazione ossidativa, cambiamenti morfologici e anche un'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Choi, et al., 2013). Inoltre, PINK1 è coinvolta nei primi step della mitofagia, agendo a monte di Parkin, una E3 ubiquitin ligasi codificata da PARK2 (Kitada, et al., 1998). In virtù della sua attività enzimatica, Parkin ubiquitina diversi target sulla membrana mitocondriale esterna (MME), inclusi MFN1, VDAC e TOM20. Ciò comporta il reclutamento dei fattori autofagici, innescando lo step finale del processo mitofagico, che culmina con la degradazione del mitocondrio danneggiato.

Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio hanno evidenziato una correlazione fra la traslocazione di Parkin sulla MME e la Calcineurina (CaN), una serina-treonina fosfatasi  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente (Crabtree, 1999). È stato dimostrato inoltre che tale evento è indipendente da PINK1, poiché l'attivazione della CaN induce la traslocazione di Parkin ai mitocondri in assenza di tale chinasi. Abbiamo quindi indagato gli effetti di tale relazione sull'attività ubiquitin ligasica di Parkin, valutando i livelli basali di proteine target di Parkin, residenti sulla membrana mitocondriale esterna. In particolare la nostra analisi è stata condotta su MFN1, VDAC e TOM20.

L'analisi è stata condotta in cellule MEFs in cui è stato espresso in transiente il mutante costitutivamente attivo della CaN ( $\Delta\text{CaN}$ ). A causa della ridotta numerosità dei replicati biologici e dei limiti tecnici rappresentati dal western blot come tecnica semiquantitativa, è necessario implementare il numero di esperimenti condotti. Tuttavia, i dati suggeriscono che l'espressione di Parkin aumenti la degradazione dei suoi substrati mitocondriali e che tale effetto sia, almeno in parte, mediato dalla CaN. Poiché a seguito dell'attivazione della CaN si è osservato una sensibile ma non significativa diminuzione dei livelli basali delle proteine analizzate anche in assenza di Parkin, non è da escludere che tali proteine siano oggetto di ubiquitinazione da parte di altre ubiquitin ligasi che risultano attive in questa condizione.



Poiché i nostri dati dimostrano che l'attivazione della CaN induce la traslocazione di Parkin indipendentemente da PINK1, evento che presuppone che Parkin sia attivo, abbiamo indagato i livelli basali di MFN1, VDAC e TOM20 in MEFs PINK1 KO. L'analisi non ha riprodotto i dati attesi sulla base di risultati consolidati e precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio. In particolare, non abbiamo riscontrato una differenza significativa nei campioni esprimenti sia la CaN attiva che Parkin in background PINK1 KO. Ciò potrebbe essere imputabile ad una ridotta efficienza di trasfezione rispetto alla controparte PINK1 WT. Si rivelano quindi necessari ulteriori esperimenti che includano la verifica dell'effettiva ed efficiente overespressione del mutante, in parallelo ad un aumento del numero di replicati.

Considerato il ruolo della CaN nell'impattare sulla traslocazione e attivazione di Parkin, abbiamo indagato la potenziale interazione fisica tra due proteine in condizioni endogene. Tale esperimento è stato eseguito in cellule HEK293 in cui, diversamente dalle MEFs, Parkin viene espresso a livello endogeno. Ci siamo chiesti se, ai fini di detectare l'interazione tramite CO-IP, fosse necessario attivare la CaN. Per mimare questa condizione, le cellule sono state pretrattate con CCCP, mentre il trattamento con DMSO è stato eseguito in parallelo come controllo. Dal blot che ne deriva si osserva che l'anticorpo anti-Parkin ha detectato correttamente l'arricchimento della proteina sia in condizioni basali (DMSO), sia in cellule trattate con CCCP. L'esperimento ha dimostrato l'esistenza di un'interazione fisica tra le due proteine. In particolare, il segnale della CaN legata a Parkin è stato rilevato solo nel campione trattato con CCCP, dimostrando che tale stimolo è necessario per rilevare l'interazione delle due proteine.

La conseguenza logica di tale evidenza è l'indagine del potenziale residuo di Parkin defosforilato dalla CaN, supponendo un'interazione diretta tra le due proteine. Poiché i nostri dati dimostrano che la defosforilazione mediata dalla CaN attiva Parkin, è logico concludere che la fosforilazione eserciti un effetto opposto, ossia lo inattivi. In letteratura sono riportati solamente due residui che inattivano Parkin a seguito di fosforilazione: Tyr143 (Ko, et al., 2010) e Ser131 (Im & Chung, 2015). Poiché la CaN è una fosfatasi Ser/Thr e partendo dall'ipotesi che l'interazione sia diretta, il residuo di Tyr è stato scartato a priori. In parallelo, abbiamo ricercato delle sequenze consenso della CaN: di tutte quelle descritte solo una, la SPPASPP, risulta avere una somiglianza con una porzione della sequenza di Parkin: SPPAGSPA. Quest'ultima ha come primo residuo proprio il sito Ser131, la cui fosforilazione provoca l'inattivazione di Parkin mediata dalla chinasi Dyrk1A. Questa proteina antagonizza l'azione della CaN fosforilando alcuni dei suoi substrati tra i quali i fattori di trascrizione della famiglia NFATs (Kuhn, et al., 2009). Sarebbe interessante indagare se anche Parkin rappresenti un substrato condiviso tra Dyrk1A e CaN.

Alla luce di queste evidenze è stato eseguito un esperimento preliminare su cellule HEK293 i cui livelli endogeni di Parkin sono detectabili tramite Western Blot. Tuttavia, l'impiego del fosfoanticorpo Parkin Ser131 non ha condotto a un risultato definitivo, in quanto il pattern di band ottenuto rende difficoltosa l'identificazione della corretta banda per Parkin. Per ovviare a questo inconveniente tecnico, l'esperimento potrebbe essere ripetuto in condizioni di overespressione di Parkin.

Nel loro insieme questi dati rappresentano una parte di un lavoro più ampio volto a indagare il ruolo della fosfatasi CaN nel regolare la traslocazione mitocondriale di Parkin e la sua attivazione. Corroborata l'esistenza dell'interazione fisica tra le proteine, futuri esperimenti potrebbero concentrarsi nell'identificazione del/i residuo/i di Parkin coinvolti. L'esistenza di una sola sequenza di Parkin che ricalchi la sequenza consenso per la CaN non rappresenta a priori la dimostrazione di un'interazione diretta né esclude la possibilità che la CaN possa esercitare la sua azione su altri siti di Parkin. Tuttavia, alla luce delle evidenze precedentemente esposte, il residuo Parkin Ser131 è sicuramente un target interessante da cui partire per delucidare il meccanismo molecolare alla base dell'attivazione di Parkin mediata dalla CaN.

## 6. Bibliografia

- Ashrafi, G. & Schwarz, T. L., 2015. PINK1- and PARK2-mediated local mitophagy in distal neuronal axons. *Autophagy*, Volume 11, pp. 187-189.
- Cereghetti, G. M. et al., 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 12803-15808.
- Chan, N. C. et al., 2011. Broad activation of the ubiquitin–proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Human Molecular Genetics*, 20(9), p. 1726–1737.
- Choi, I. et al., 2013. PINK1 Deficiency Attenuates Astrocyte Proliferation Through Mitochondrial Dysfunction, Reduced AKT and Increased p38 MAPK Activation, and Downregulation of EGFR. *Glia*, 61(5), p. 800–812.
- Crabtree, G. R., 1999. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell*.
- Deas, E. et al., 2011. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Human molecular genetics*, Volume 20(5), pp. 867-879.
- Dickey, A. S. & Strack, S., 2011. PKA/AKAP1 and PP2A/B $\delta$ 2 Regulate Neuronal Morphogenesis via Drp1 Phosphorylation and Mitochondrial Bioenergetics. *The Journal of Neuroscience*, Novembre 2, 32(44), p. 15716 –15726.
- Eiyam, A. & Koji, O., April 2015. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 95-101.
- Geisler, S. et al., 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, Volume 12, p. 119–131.
- Glaser, L., Sonnay, S., Stafa, K. & Moore, D. J., 2011. Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *Journal of Neurochemistry*, 118(4), pp. 636-645.
- Greene, A. W. et al., 2012. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO reports*, p. 378–385.
- Im, E. & Chung, K. C., 2015. Dyrk1A phosphorylates parkin at Ser-131 and negatively regulates its ubiquitin E3 ligase activity. *Journal of Neurochemistry*, 134(4), pp. 756-758.
- Karbowski, M. & Youle, R. J., 2011. Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Current opinion in cell biology*, 23(4), p. 476–482.
- Karp, G., 2015. *Biologia Cellulare e Molecolare - Concetti ed Esperimenti*. s.l.:EdiSES.
- Kazlauskaitė, A. et al., 2014. Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *The Biochemical journal*, 25 Aprile, Volume 460 (1), pp. 127-39.
- Kitada, T. et al., 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, pp. 605-608.
- Klee, C. B., Crouch, T. H. & Krinks, M. H., 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 6270-6273.
- Klee, C. B., Ren, H. & Wang, X., 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *The Journal of biological chemistry*, 29 Maggio, Volume 273, p. 13367–13370.

- Ko, H. S. et al., 2010. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), p. 16691–16696.
- Kuhn, C. et al., 2009. DYRK1A Is a Novel Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), pp. 17320-17327.
- Li, H. et al., 2007. Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *Journal of molecular biology*, 369(5), p. 1296–1306.
- Li, H. et al., 2007. Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *Journal of molecular biology*, 369(5), p. 1296–1306.
- Li, H. et al., 2007. Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *Journal of molecular biology*, 369(5), p. 1296–1306.
- Medina, D. L. et al., 2015. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature cell biology*, 17(3), p. 288–299.
- Molkentin, J. D., 2000. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circulation research*, pp. 731-738.
- Narendra, D. P. et al., 2010. *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin.* [Online]  
Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>
- Narendra, D., Walker, J. E. & Youle, R., 2012. Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1 Nov.
- Schubert, A. F. et al., 2017. Structure of PINK1 in complex with its substrate ubiquitin. *Nature*, Volume 552(7683), pp. 51-56.
- Sheftic, S. R., Page, R. & Peti, W., 2016. Investigating the human Calcineurin Interaction Network using the  $\pi\phi$ LxVP SLiM. *Scientific Reports*, Volume 6.
- Trempe, J. F. et al., 2013. Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science*, pp. 1451-1455.
- Twig, G. & Shirihai, O. S., 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), p. 1939–1951.
- Valente, E. M. et al., 2004. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Annals of neurology*.
- Vega, R. B. et al., 2002. Multiple Domains of MCIP1 Contribute to Inhibition of Calcineurin Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(33), p. 30401–30407.
- Wang, X. et al., 2011. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. 147(4), pp. 893-906.
- Yoshii, S. R., Kishi, C., Ishihara, N. & Mizushima, N., 2011. Parkin Mediates Proteasome-dependent Protein Degradation and Rupture of the Outer Mitochondrial Membrane. *The Journal of biological chemistry*, 286(22), p. 19630–19640.
- Yun, J. et al., 2014. MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin. *eLife*, 3(e01958).