

**Ruolo delle alterazioni mitocondriali  
nel processo di morte cellulare in patologie  
neurodegenerative**



**Elisabetta Mormone**  
*Dottorato di Ricerca in*  
*Biologia Cellulare e Molecolare*  
*XIX Ciclo*

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE  
XIX Ciclo**

*Ruolo delle alterazioni mitocondriali nel processo di morte  
cellulare in patologie neurodegenerative*

*Elisabetta Mormone*

**Docenti guida**

*Prof. Mauro Piacentini*

*Prof. Walter Malorni*

## **INDICE**

### **INTRODUZIONE**

- 1. I mitocondri**
  - 1.1 Struttura e funzione
  - 1.2 Fissione e Fusione mitocondriale
  
- 2. Processo di Morte Cellulare (PCD)**
  - 2.1 Apoptosi
  - 2.2 Via mitocondriale dell'Apoptosi
  - 2.3 Famiglia di Bcl-2
  - 2.4 Autofagia
  
- 3. Transglutaminasi**
  - 3.1 Transglutaminasi 2 (TG2)
  - 3.2 Struttura della TG2
  - 3.3 Relazione tra espressione della TG2-apoptosi e funzione mitocondriale
  - 3.4 TG2 e malattie neurodegenerative
  
- 4. Corea di Huntington**
  - 4.1 Apoptosi e corea di Huntington
  - 4.2 Autofagia e corea di Huntington

### **SCOPO DELLA TESI**

### **MATERIALI E METODI**

- 1. Analisi della sequenza consensus BH3 vs TG2**
- 2. Trasfezioni e colture cellulari**
- 3. Peptidi sintetici**
- 4. Studio della morte cellulare e dell'apoptosi**

- 5. Misura del potenziale della membrana mitocondriale**
- 6. Immunofluorescenza**
- 7. Analisi del rilascio del citocromo c in cellule vitali e mitocondri isolati**
- 8. Trattamento dei mitocondri coi peptidi**
- 9. Coprecipitazioni**
- 10. Immunoprecipitazioni**
- 11. Analisi delle proteine substrato della TG2**
- 12. Colture cellulari linfoblastoidi**
- 13. Induzione e analisi della morte cellulare**
- 14. Microscopia elettronica**
- 15. Misura del potenziale della membrana mitocondriale**
- 16. Microscopia a fluorescenza**

#### **RISULTATI (I PARTE)**

- 1. Identificazione ed analisi del dominio BH3 della TG2**
- 2. Il peptide TG2-BH3 induce morte cellulare per apoptosi**
- 3. Il peptide TG2-BH3 induce la depolarizzazione mitocondriale**
- 4. Il peptide TG2-BH3 induce rilascio di citocromo c sia nelle cellule sia nei mitocondri isolati**
- 5. Il peptide TG2-BH3 induce traslocazione di Bax sui mitocondri e condensazione nucleare**
- 6. Il peptide TG2-BH3 interagisce con Bax**
- 7. La TG2 media la via mitocondriale dell'apoptosi interagendo con Bax**
- 8. Sui mitocondri Bax agisce come substrato della TG2**

#### **RISULTATI (II PARTE)**

- 1. Analisi della risposta a diversi stimoli di morte di linfoblasti HD**
- 2. Analisi ultrastrutturale della morte cellulare nei linfoblasti HD**
- 3. Analisi del potenziale della membrana mitocondriale**

**4. Analisi dell'autofagia nei linfoblasti HD mediante  
microscopia a fluorescenza**

**DISCUSSIONE**

**BIBLIOGRAFIA**



## **INTRODUZIONE**



# 1. I mitocondri

## 1.1 Struttura e funzione

I mitocondri sono organelli citoplasmatici in grado di svolgere molteplici funzioni. La più importante tra esse consiste nell'estrarre energia dai substrati organici che gli arrivano per produrre un gradiente ionico che viene sfruttato per produrre adenosina trifosfato (ATP).

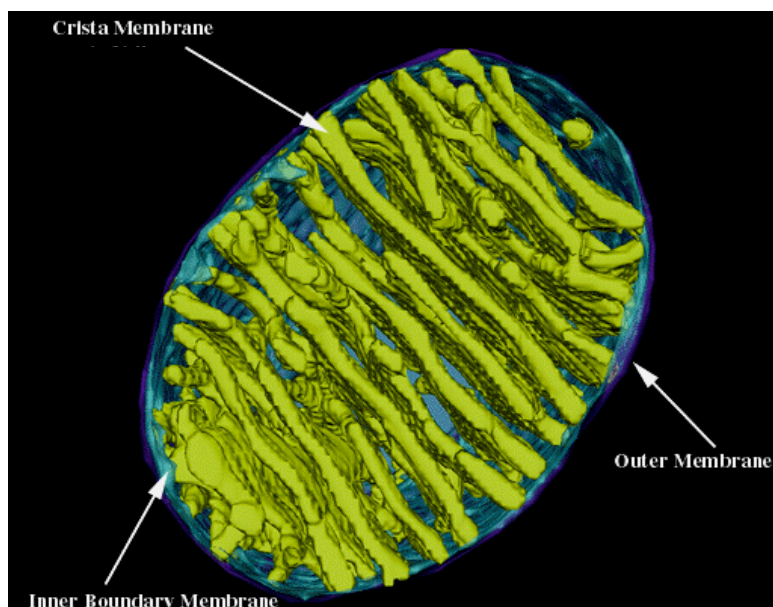
La struttura dei mitocondri è molto peculiare: sono formati da due membrane, quella esterna permette il passaggio di piccole molecole, quella interna è selettivamente permeabile e ripiegata in estroflessioni chiamate creste mitocondriali, che ne aumentano la superficie. Le due membrane identificano due differenti regioni: lo *spazio intermembrana*, quello delimitato dalla membrana esterna e quella interna, e la *matrice*, circoscritto dalla membrana interna (**Figura I**). La membrana interna si presenta sotto forma di numerosi avvolgimenti, rientranze e sporgenze, queste sono dette appunto creste mitocondriali. La funzione di queste strutture è aumentare la superficie di membrana che permette di disporre un numero maggiore di complessi di ATP sintetasi.

La produzione di energia viene svolta utilizzando i principali prodotti della glicolisi: il piruvato ed il NADH. Essi vengono sfruttati in due processi: il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa.

Durante la fosforilazione ossidativa, i trasportatori ridotti di elettroni NADH e FADH<sub>2</sub> (prodotti dalla glicolisi e dal ciclo di Krebs) trasferiscono, con un meccanismo a navetta, i loro equivalenti di riduzione nella matrice mitocondriale. Cinque complessi enzimatici sono inclusi nella membrana mitocondriale interna (I, II, III, IV e V). I complessi I e II ricevono gli elettroni dall'ossidazione, rispettivamente del NADH e del succinato e li trasferiscono ad un trasportatore di elettroni lipidico, il coenzima Q. Il complesso III ossida la forma ridotta del coenzima Q e riduce il citocromo c, un trasportatore proteico di elettroni. Il complesso IV accoppia l'ossidazione del citocromo c alla riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua.

Le reazioni catalizzate dai complessi I, III e IV forniscono anche l'energia per trasportare i protoni (H<sup>+</sup>) nello spazio intermembrana, rendendolo più acido della matrice mitocondriale. La dissipazione del risultante gradiente protonico, con il rientro degli H<sup>+</sup> nella matrice, attraverso uno specifico canale ionico presente nel complesso V, genera l'energia che è

usata da questo complesso per promuovere la sintesi endoergonica di ATP, a partire da adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorganico.



**Figura I.** Membrana Mitocondriale Interna , in giallo. Membrana Mitocondriale Esterna, in blu. Spazio Intermembrana, in celeste.

## 1.2 Fissione e Fusione mitocondriale

I mitocondri sono organelli dinamici il cui numero, la cui misura e posizione, variano all'interno di ciascun tipo cellulare, anche in risposta alle diverse richieste di energia da parte della cellula stessa. La fissione e la fusione mitocondriale sono due processi fondamentali per il mantenimento della morfologia, e distribuzione dei mitocondri ed anche per la proliferazione e differenziazione cellulare. Il processo di fusione mitocondriale è necessario per il mantenimento della rete dei mitocondri e per il buon funzionamento di questi organelli. Infatti, una rete fittamente interconnessa, può facilitare il trasferimento del potenziale di membrana da regioni povere a regioni ricche di ossigeno (Skulachev, 2001). In *Drosophila*, per esempio, la fusione è necessaria durante lo sviluppo, perché

regola la spermatogenesi. Infatti, bloccando la fusione, mediante la mutazione del gene fuzzy onion (Fzo), si ottengono dei maschi sterili (Hales and Fuller, 1997). Inoltre è noto che un eccesso di fissione e la mancanza di fusione, comportano la rottura della rete mitocondriale con conseguente perdita del DNA mitocondriale, difetti nella catena respiratoria e un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Yaffe, 1999).

Tuttavia, i meccanismi molecolari che regolano l'equilibrio dinamico tra fissione e fusione, non sono ancora stati chiariti completamente. Studi condotti in *lievito*, *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*, hanno identificato una serie di fattori chiave, il cui ruolo è fondamentale per i processi di fusione e fissione.

Nelle cellule di mammifero, la fissione mitocondriale, è regolata dalla proteina Dynamin-related protein 1 (Drp-1), una grande proteina ad attività GTPasica (Smirnova et al., 1998; Smirnova et al., 2001) la cui sequenza amminoacidica presenta delle significative similitudini con quella delle dinamine. Le dinamine sono delle proteine ad attività GTPasica, che regolano il traffico vescicolare e l'endocitosi, tuttavia le funzioni molecolari delle dinamine e di Drp-1 non sono ancora molto chiare. Sulla base di studi di genetica, biologia cellulare e biochimica, sono stati proposti due modelli che spiegherebbero il meccanismo di azione delle dinamine e di Drp-1. Un modello propone che queste proteine funzionino da meccanoenzimi, che partecipano attivamente alla costrizione e scissione delle membrane, l'altro modello, invece, prevede che agiscano non direttamente ma reclutando e attivando un effettore, che medierebbe la curvatura e la fissione (Sever et al., 1999). Probabili effettori sono le endofiline, in particolare l'Endofilina 1, una proteina presinaptica che coopera con le dinamine per mediare la curvatura della membrana e la gemmazione delle vescicole durante l'endocitosi (Ringstad et al., 1999; Schmidt et al 1999). Tuttavia, l'interazione tra Drp-1 e le endofiline non è stata ancora individuata.

Drp-1 normalmente si trova nel citoplasma e si accumula sui mitocondri, nei siti di fissione (Smirnova et al., 2001), il suo reclutamento a livello dei mitocondri, avviene attraverso la proteina mitocondriale Fis1, una piccola proteina di fissione caratterizzata all'estremità C terminale da un'elica transmembrana (Mozdy et al 2000). Sebbene Fis1 e Drp-1 siano i regolatori chiave della fissione mitocondriale nei mammiferi, anche altre proteine sono coinvolte in questo processo. Tra queste un analogo della proteina di lievito Mdv1p.

Il meccanismo di fusione, dall'altra parte nonostante sia legato a quello di fissione, utilizza un set di proteine effettrici evolutivamente conservate ma

diverse da quelle di fissione. Tra queste ci sono le proteine transmembrana ad attività GTPasica Mfn1 e Mfn2 (Santel and Fuller, 2001). Mfn è caratterizzata da un dominio N-terminale, ad attività GTPasica, simile a quello delle dinamine e un dominio C-terminale omologo a Fzo, il quale contiene un dominio transmembrana (Jaroszewski et al., 2002; Rojo et al., 2002). In diversi esperimenti è stato visto che in alcune linee cellulari, la coespressione di Mfn2 e del dominante negativo di Drp-1 risulta in mitocondri interconnessi e allungati (Santel and Fuller, 2001).

OPA-1 è un altro fattore implicato nella fusione mitocondriale, si tratta di una proteina ad attività GTPasica ma la sua funzione e localizzazione subcellulare sono distinte da quelle di Drp-1. In lievito la delezione dell'ortologo di OPA-1, MGM1, comporta un'estesa frammentazione mitocondriale, la perdita del DNA mitocondriale, una respirazione deficitaria ed una abnorme struttura delle creste (Wong et al., 2000). E' probabile che OPA-1 e Mfn collaborino nella fusione mitocondriale come fanno gli ortologi di lievito, sebbene ciò non sia stato ancora dimostrato.

OPA-1 si trova nella membrana mitocondriale interna dalla parte dello spazio intermembrana. Tuttavia è stato riportato che OPA-1 sia presente anche sulle creste, nello spazio intermembrana e persino sulla membrana esterna (Satoh et al., 2003). E' noto che esistono diverse forme di OPA-1 con diverso peso molecolare che quindi potrebbero avere funzioni e localizzazione cellulare diverse (Satoh et al., 2003).

## 2. Processo di Morte Cellulare (PCD)

### 2.1 Apoptosi

L'*Apoptosi* è una forma fisiologica di morte cellulare, che si verifica sia in condizioni normali che patologiche. Evento di fondamentale importanza durante lo sviluppo degli organi, per l'omeostasi tissutale e per l'eliminazione di cellule danneggiate o pericolose per l'organismo (Beaulaton and Locksin, 1982; Fesus et al., 1991; Hale et al., 1996; Milligan and Schwarz, 1997; Dragovich et al., 1998).

Il termine "apoptosi" deriva dal greco "απο-πτωσις" e indica il processo di caduta delle foglie dagli alberi. Tale termine è stato scelto, nel 1972, da Kerr, Wyllie e Curie, per distinguere questo tipo di morte cellulare dalla necrosi, trovando un'analogia tra il significato del termine e l'eliminazione delle cellule dai tessuti.

La morte cellulare programmata interessa, in genere, singole cellule e non è mai accompagnata da fenomeni infiammatori. Può essere innescata da segnali sia extracellulari che intracellulari, che vengono amplificati da secondi messaggeri e dall'attivazione a cascata di una particolare famiglia di proteasi a cisteina, denominate caspasi (Dragovich et al., 1998). Si possono distinguere tre fasi: una iniziale, l'induzione stimolo dipendente, una effettrice, in cui si ha l'avvio del programma di morte, e una di esecuzione, che si conclude con l'eliminazione della cellula (Martin et al., 1994).

Le cellule apoptotiche, nel corso del processo di morte, vanno incontro a profonde modificazioni morfologiche e biochimiche che portano alla formazione dei corpi apoptotici e alla loro fagocitosi (Wyllie et al., 1980). All'inizio, si osserva un cambiamento delle dimensioni e della morfologia del nucleo: la cromatina si condensa (picnosi) e si addossa all'involucro nucleare, che inizia ad invaginarsi divenendo dentellato fino a frammentarsi. Le masserelle che si formano possono essere prive della membrana, ma mantengono contorni ben definiti (Wyllie et al., 1980). Per quanto riguarda il citoplasma, questo subisce una drastica riduzione di volume e si osserva un marcato addensamento degli organuli, che, tuttavia, rimangono integri. La cellula, contemporaneamente, perde le connessioni con le cellule adiacenti e le strutture specializzate di superficie come i microvilli (Wyllie et al., 1980; Beaulaton and Lockshin, 1982). Sulla superficie cellulare si formano diverse vescicolazioni ("blebs"), che in seguito si distaccano, provocando la

disgregazione della cellula in frammenti delimitati da membrana plasmatica (Wyllie et al., 1980).

Della cellula iniziale rimangono solo un gran numero di “corpi apoptotici”, contenenti citoplasma e organelli, che differiscono tra loro, oltre che per le dimensioni anche per il contenuto: alcuni racchiudono uno o più aggregati di cromatina, altri ne sono completamente privi (Wyllie et al., 1980). I corpi apoptotici presentano, a livello della loro superficie, significative modificazioni come l'espressione di glicoproteine di membrana prive di acido sialico (Wyllie, 1987) e l'esposizione della fosfatidilserina (PS) dalla parte esterna del plasmalemma; tale rivestimento esterno alterato viene selettivamente riconosciuto da cellule ad azione fagocitaria come i macrofagi (Wyllie et al., 1987). L'apoptosi è un evento molto rapido: formazione, riconoscimento e fagocitosi dei corpi apoptotici si realizzano in pochi minuti e tale rapidità è di fondamentale importanza, in quanto la rottura di tali corpi determinerebbe una risposta infiammatoria potenzialmente dannosa (Halsett, 1992).

Grazie a studi condotti sul nematode *Caenorhabditis elegans* sono stati identificati tre geni essenziali per il controllo e l'esecuzione del programma di morte (Ellis and Horvitz, 1986; Yuan et al., 1993). Questi geni, che hanno un omologo sia nei mammiferi che in *Drosophila*, sono chiamati ced (cell death defective) (Ellis et al., 1991).

Il gene CED-9 è essenziale per la sopravvivenza; mutazioni che lo rendono attivo quando non dovrebbe, mutazioni "gain of function", comportano la sopravvivenza di cellule che dovrebbero morire, d'altra parte mutazioni “loss of function” portano alla morte di cellule che dovrebbero sopravvivere (Hengartner et al., 1992; Hengartner e Horvitz, 1994). CED-3 e CED-4 sono gli esecutori del programma di morte; dalla competizione tra l'attività pro-apoptotica di CED-3 e CED-4 e quella anti-apoptotica di CED-9 dipende il destino delle cellule embrionali. Sempre grazie agli studi su *C. elegans*, si è visto che CED-4 sta a monte di CED-3, mentre CED-9 sarebbe un regolatore negativo di CED-4 (Shaham and Horvitz, 1996). La controparte di CED-9 nei mammiferi è costituita dai membri anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2, come Bcl-2 stesso e Bcl-X<sub>L</sub> (Yuan et al., 1993). L'omologo di CED-3 è la grande famiglia delle proteasi a cisteina, dette caspasi (Yuan et al., 1993). La controparte di CED-4 è Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), una proteina la cui funzione è quella di attivare le caspasi (Zou et al., 1997).

Esistono, come accennato, diversi stimoli, sia extracellulari che intracellulari, in grado di indurre apoptosi: il sistema ligando di Fas/recettore

di Fas, la **via mitocondriale**, una probabile via che coinvolge il reticolo endoplasmatico e vie di morte caspasi-indipendenti.

## **2.2 Via mitocondriale dell'Apoptosi**

I mitocondri sono anche il punto di controllo principale dell'apoptosi innescata da vari stimoli, ad esempio raggi UV, agenti chemioterapici ed allontanamento di fattori di crescita e di citochine. Questi organelli, attraverso il rilascio di citocromo c e di altri fattori pro- e/o anti-apoptotici coordinano sia l'attivazione delle caspasi che l'amplificazione dei segnali di morte.

Il rilascio di citocromo c dallo spazio intermembrana avviene ad opera di Bax e Bak, due proteine multidominio con attività pro-apoptotica appartenenti alla famiglia di Bcl-2. Bax, in forma monomerica, è preferenzialmente localizzato nel citoplasma, ma si ritrova anche sulle membrane degli organuli intracellulari. In seguito all'induzione di apoptosi si osserva la traslocazione di Bax sulla membrana mitocondriale esterna e la sua oligomerizzazione. Bak, invece, si trova normalmente associato alle membrane intracellulari e quindi anche alla membrana mitocondriale esterna, ed in seguito all'induzione di morte anche lui forma degli oligomeri. Questi e quelli di Bax mediano il rilascio del citocromo c (Mikhailov et al., 2001). La formazione di oligomeri e la conseguente permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna, possono essere indotte da una classe particolare di proteine della famiglia di Bcl-2 detta "BH3-only proteins" (proteine contenenti soltanto il dominio BH3), mentre risulta inibita dai fattori anti-apoptotici della stessa famiglia (Ferri and Kroemer, 2001).

Subito dopo aver raggiunto il citoplasma, il citocromo c promuove l'assemblaggio di un complesso proteico che lega ed attiva la procaspasi-9. Questo complesso, denominato apoptosoma (Li et al., 1997), è composto da citocromo c, dATP o ATP e Apaf-1. Apaf-1 è una proteina di circa 130 kDa caratterizzata da un dominio N-terminale, per il reclutamento delle caspasi (CARD), da un braccio flessibile omologo a CED-4 di *C.elegans*, a livello del quale avviene il legame con ATP/dATP e da un dominio C-terminale che ha la forma di una "Y". Questo dominio contiene 12 o 13 elementi WD-40 necessari per l'interazione col citocromo c (Aechan et al., 2002).

Il modello proposto da Aechan e colleghi per l'assemblaggio dell'apoptosoma, prevede che la proteina Apaf-1 vada incontro a due cambiamenti conformazionali. Questi cambiamenti permetterebbero

l'oligomerizzazione di sette molecole di Apaf-1, in modo che si formi un complesso in cui le proteine si dispongono a raggiera e delimitano una cavità centrale. A livello di questa cavità verrebbero ad interagire sette molecole di procaspasi-9. Si pensa che, nella forma inattiva, Apaf-1 abbia il dominio N-terminale CARD bloccato tra i due bracci del dominio C-terminale a forma di "Y" (Acehan et al., 2002). È verosimile che il citocromo c, quando si lega ad Apaf-1, a livello degli elementi WD-40, provochi il primo cambiamento conformazionale di Apaf-1, in seguito al quale il dominio CARD si sposta e rende il dominio omologo a CED-4 disponibile al legame con l'ATP. Il legame di ATP, ma non la sua idrolisi, sembra richiesto per il corretto funzionamento dell'apoptosoma (Jiang and Wang, 2000). Questo legame con l'ATP provocherebbe il secondo cambio conformazionale di Apaf-1, in seguito al quale avverrebbero simultaneamente l'oligomerizzazione e il reclutamento delle procaspasi-9. Il dominio CARD di ciascuna molecola di Apaf-1 sembra spinto in posizione diametralmente opposta a quella iniziale, in modo da legare il dominio CARD della procaspasi-9, a livello del poro centrale generatosi in seguito all'oligomerizzazione. Il risultato di queste interazioni è la formazione di una struttura nella quale le sette molecole di procaspasi-9 si dispongono perpendicolarmente all'apoptosoma. Ogni procaspasi-9 nell'apoptosoma è un monomero inattivo, che matura solo dopo essersi legato, in modo testa-coda, con un'altra molecola di procaspasi-9. In ciascun dimero che si forma in questo modo solo il monomero legato all'apoptosoma presenta attività catalitica (Ratus et al., 2001).

Oltre a promuovere l'attivazione della caspasi-9, Apaf-1 è necessario anche per una piena attività catalitica della stessa; infatti, è stata osservata una differenza tra l'attività proteolitica della caspasi-9 libera e quella della caspasi coniugata con Apaf-1, avendo quest'ultima un'attività mille volte superiore (Rodriguez and Lazebnik, 1999).

La caspasi-9 matura proteolizza la procaspasi-3, rendendola attiva, e questa a sua volta agisce sulle proteine bersaglio, innescando la cascata di eventi che portano all'esecuzione del programma di morte.

I mitocondri non rilasciano solo il citocromo c ma anche altri fattori, sia pro- che anti-apoptotici, tra i quali: AIF (Apoptosis Inducing Factor), una flavoproteina di 57 KDa normalmente sita nello spazio intermembrana del mitocondrio, la quale, una volta rilasciata, trasloca nel nucleo dove promuove la frammentazione della cromatina (Ferri and Kroemer, 2001); Endonucleasi G, un'altra proteina che, dopo il suo rilascio nel citosol, trasloca nel nucleo dove agisce frammentando il DNA (Ravagnan et al., 2002); Smac/Diablo, un fattore pro-apoptotico che neutralizza alcuni

inibitori delle caspasi noti come IAPs (Finkel, 2001); IAPs (Inibitors of Apoptosis Proteins), molecole che limitano l'attività dell'apoptosoma associandosi e bloccando la caspasi-9; quindi IAP funzionerebbe competendo per lo stesso sito di legame di Smac-Diablo sulla caspasi-9 (Srinivasula et al., 2001).

La permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna ed il rilascio di citocromo c dallo spazio intermembrana, rappresentano eventi precoci che si verificano nel processo di morte cellulare programmata mediata dai mitocondri (Szewczyk and Wojtczak, 2002). Successivamente si verifica anche la permeabilizzazione della membrana mitocondriale interna (Ferri and Kroemer, 2001).

È stato osservato che l'alterazione dell'omeostasi mitocondriale determina uno squilibrio nello stato redox con conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Desagher and Martinou, 2000; Kroemer et al., 1997; Li et al., 1999). Questa osservazione è confermata dall'azione inibitoria dei processi apoptotici esercitata da sostanze antiossidanti (Fadell et al., 1999; Jacobson, 1996; Malorni et al., 1993). Lo squilibrio ossidativo, caratterizzato da iperproduzione di ROS e diminuzione dei livelli intracellulari di molecole antiossidanti, quali GSH, sembra giocare un ruolo importante sia nell'innescare, sia nello svolgimento del processo apoptotico.

L'integrazione e l'amplificazione dei segnali di morte che si osservano nelle cellule sono notevolmente complesse e la sola connessione tra i due percorsi apoptotici, sistema ligando-recettore e via mitocondriale, ne è un buon esempio. Il recettore Fas, attivato dal suo ligando, induce indirettamente la maturazione della procaspasi-8, la quale è in grado sia di innescare la caspasi-3, fondamentale per l'esecuzione del programma di morte (Scaffidi et al., 1998), sia di agire sulla proteina della famiglia di Bcl-2, Bid (22 KDa), tagliandola in due frammenti. La porzione C-terminale, tBid (15 KDa), è la molecola attiva capace di traslocare sul mitocondrio, dove promuove il cambiamento conformazionale e l'oligomerizzazione di Bax e Bak. Il conseguente rilascio di citocromo c induce la formazione dell'apoptosoma, il quale innesca sia la cascata di eventi caratteristici della via mitocondriale, sia l'amplificazione del segnale di morte, attraverso un'ulteriore attivazione della caspasi-8 (Slee et al., 1999a; Slee et al., 1999b).

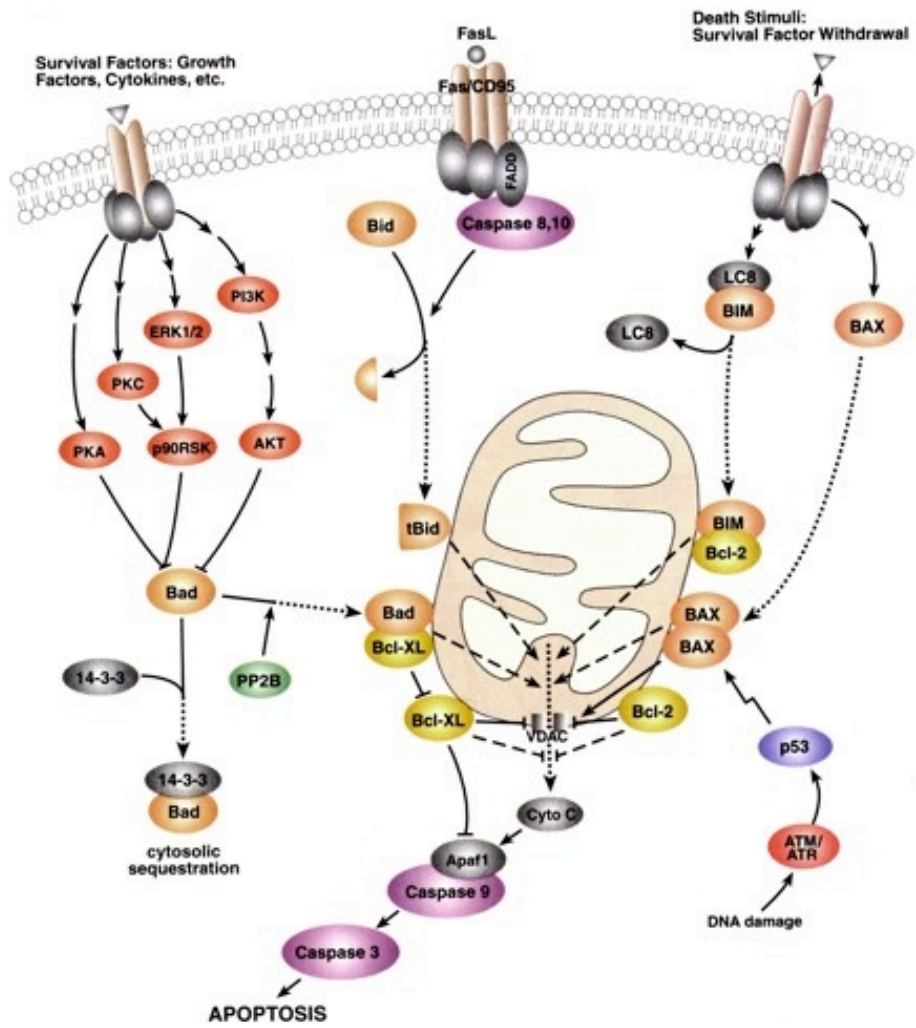


Figura II. Via mitocondriale dell' Apoptosi.

## 2.3 Famiglia di Bcl-2

Le proteine della famiglia di Bcl-2 sono regolatori chiave, che controllano l'omeostasi mitocondriale e mediano il rilascio dei fattori pro- ed anti-apoptotici dai mitocondri. Per questo motivo mutazioni nei geni codificanti per tali proteine possono avere effetti profondi sullo sviluppo embrionale e sulla patogenesi di molte malattie (Kaufmann and Hengartner, 2001). In base a criteri funzionali e strutturali, la famiglia di Bcl-2 è stata suddivisa in tre gruppi:

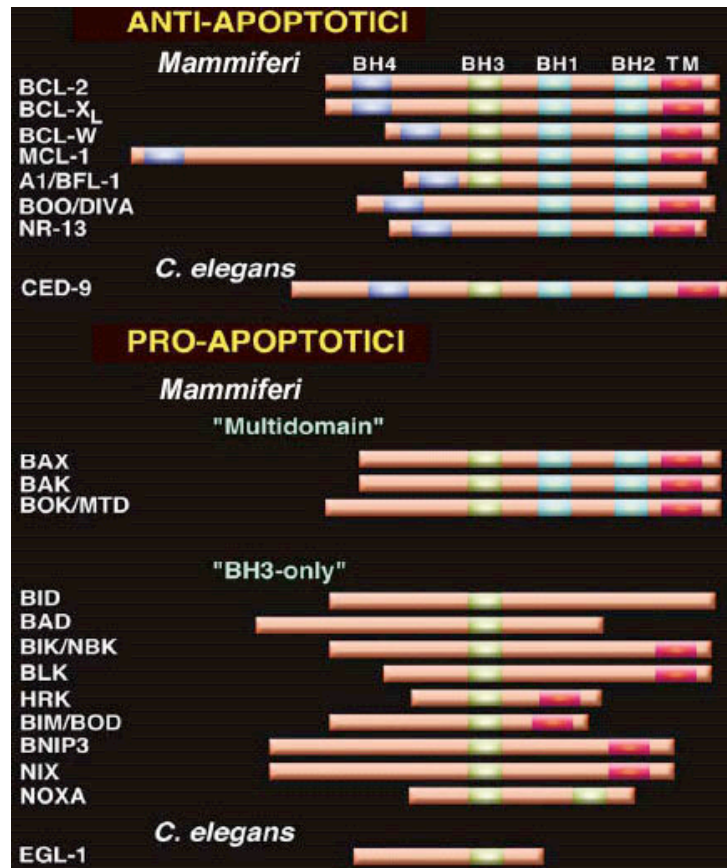


Figura III. Domini delle proteine della famiglia di Bcl-2.

**Gruppo I:** costituito da Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Div1 e Nrf3. Tutte queste proteine presentano attività anti-apoptotica e sono caratterizzate dalla presenza di quattro brevi domini ad elevata omologia con Bcl-2, conosciuti come BH1, BH2, BH3 e BH4 (BH: Bcl-2 Homology). Molte proteine di questo gruppo presentano anche un dominio di circa 20 residui aminoacidici idrofobici alla estremità C-terminale, mediante il quale si ancorano alla superficie citoplasmatica di varie membrane intracellulari, come la membrana mitocondriale esterna, quella del reticolo endoplasmatico e quella nucleare. Queste proteine prevengono la morte cellulare interagendo con i membri della famiglia che presentano attività pro-apoptotica. Tale interazione può rendere la controparte funzionalmente inattiva oppure può relegarla in un ambito intracellulare nel quale non ha più effetto (Kaufmann and Hengartner, 2001).

Il proto-oncogene **Bcl-2** (B-cell lymphoma leukemia-2) è un regolatore molto importante della morte cellulare programmata. Tale gene è espresso normalmente in una grande varietà di tessuti, ed inibisce l'induzione dell'apoptosi in molti sistemi sperimentali.

**Bcl-x<sub>L</sub>** presenta un'identità aminoacidica del 44% con Bcl-2.

La localizzazione subcellulare di queste due proteine è simile, infatti, Bcl-2 si trova sull'involucro nucleare, sulla membrana mitocondriale esterna e su quella del reticolo endoplasmatico (McDonnell et al., 1990), mentre Bcl-x<sub>L</sub> è localizzato sull'involucro nucleare e sulla membrana mitocondriale esterna.

Sia per Bcl-2 che per Bcl-x<sub>L</sub> i domini BH1, BH2 e BH3 sono fondamentali per mediare l'interazione con i membri pro-apoptotici della famiglia (Korsmeyer et al., 1993; Sedlak et al., 1995; Yang et al., 1995). In particolare, l'analisi strutturale di Bcl-x<sub>L</sub> complessato con un peptide che mima il dominio BH3 della proteina multidominio pro-apoptotica Bak, ha rivelato come il dominio BH3 si leghi in una tasca idrofobica di Bcl-x<sub>L</sub>, formata dai domini BH1, BH2 e BH3, attraverso interazioni idrofobiche (Sattler et al., 1997). La regione N-terminale, che contiene il dominio BH4, è indispensabile per la funzione anti-apoptotica di Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>. Infatti, mutazioni a carico dei dieci residui conservati o la loro rimozione, ad opera di caspasi e calpaine, inducono una riduzione o addirittura una perdita dell'attività di queste proteine (Cheng et al., 1997).

Il meccanismo attraverso il quale le cellule che iperesprimono Bcl-2 sono protette dalla morte consiste nella capacità di Bcl-2 di formare eterodimeri con Bax a livello della membrana mitocondriale esterna. Questa interazione

impedisce l'oligomerizzazione di Bax ed il conseguente rilascio di citocromo c necessario per l'attivazione delle caspasi (Oltvai et al., 1993).

Studi più recenti suggeriscono che Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub> possano inibire l'apoptosi anche senza interagire direttamente con Bax. Sembra, infatti, che Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub> sequestrino le proteine "BH3-only", formando complessi stabili sul mitocondrio e in tal modo prevenendo l'attivazione di Bax e Bak (Cheng et al., 2001). Inoltre, quando Bcl-2 si trova sul RE può legare alcune proteine "BH3-only" e, relegandole in questo ambito, impedire l'attivazione di Bax e Bak sul mitocondrio (Thomenius et al., 2003).

Molto probabilmente Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub> sono in grado di inibire l'apoptosi anche indipendentemente dal loro legame con i membri pro-apoptotici della famiglia. È stato osservato, infatti, che la proteina Bcl-2 mutata in modo che non possa più localizzarsi sulle membrane degli organuli intracellulari, è ancora in grado di inibire l'apoptosi (Oltvai et al., 1993). Questo ha suggerito che le proteine pro-apoptotiche agiscano anche a valle del rilascio di citocromo c. È stato proposto che Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub> interagiscano con Apaf-1 per prevenire l'attivazione della caspasi-9 (Pan et al., 1998).

**Gruppo II:** comprendente Bax, Bak e Bok/Mtd. Queste proteine sono molto simili nella struttura e nella sequenza aminoacidica a quelle del gruppo I, ma risultano prive del dominio BH4 all'estremità N-terminale. I membri di questo gruppo, detti anche proteine multidominio, presentano attività pro-apoptotica e vengono regolati sia dalle proteine del gruppo I che da quelle del gruppo III (Kaufmann and Hengartner, 2001).

Il gene della proteina multidominio pro-apoptotica Bax mappa sul braccio lungo del cromosoma 19 umano, è lungo 4,5 kb ed è formato da sei esoni (Apte et al., 1995).

**Bax** mostra il 21% d'identità e il 43% di somiglianza con Bcl-2; le regioni più conservate tra le due molecole sono i domini BH1 e BH2, codificati rispettivamente dagli esoni 4 e 5.

Da alcuni esperimenti è emerso che fibroblasti di topi knock-out, sia per Bax che per Bak (Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>-/-</sup>), sono completamente resistenti a numerosi stimoli apoptotici quali radiazioni UV, privazione di fattori di crescita e trattamenti con diversi chemioterapici, mentre cellule mancanti solo di Bax (Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>+/+</sup>) o di Bak (Bax<sup>+/+</sup>/Bak<sup>-/-</sup>) non mostrano tale resistenza (Wei et al., 2001).

Una marcata espressione di Bax, in grado di reprimere l'attività soppressoria di Bcl-2, innesca l'apoptosi anche in assenza di stimoli di morte (Finucane et al., 1999). Il relativo aumento di Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> e/o di Bax/Bak,

quindi, deve essere considerato come un evento modulatore, che determina l'entrata della cellula in apoptosi.

Bax e Bak sono responsabili del rilascio del citocromo c dai mitocondri in seguito alla formazione dei loro omo-oligomeri sulla membrana mitocondriale esterna (Mikhailov et al., 2001). Entrambe queste proteine sono inattive in forma monomerica. Bax monomero è localizzato nel citosol e in percentuale molto ridotta a livello delle membrane intracellulari. Bak monomero è invece localizzato sulla membrana del RE e soprattutto sulla membrana mitocondriale esterna (Wolter et al., 1997).

La proteina Bax è strutturata in sette  $\alpha$ -eliche anfipatiche raggruppate intorno a due  $\alpha$ -eliche idrofobiche. Le prime otto sono strutturalmente simili a quelle di Bcl-X<sub>L</sub>, anche se la percentuale d'identità aminoacidica non supera il 20%. La nona  $\alpha$ -elica idrofobica, che corrisponde a quella transmembrana di Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub> e che si trova al C-terminale, serve per l'inserzione nelle membrane intracellulari e nella forma monomerica occupa la tasca idrofobica formata dai domini BH1, BH2 e BH3 mediante interazioni idrofobiche (Suzuki et al., 2000).

L'attivazione di Bax, in seguito alla trasduzione di un segnale di morte, è la conseguenza di un cambiamento conformazionale a carico sia della porzione N-terminale sia dell' $\alpha$ -elica C-terminale. I 12 residui aminoacidici N-terminali, che sono normalmente ripiegati nella forma citosolica di Bax, quando questo viene attivato si spostano in modo da consentire l'esposizione dell'elica C-terminale. L'importanza di questa estremità N-terminale nella regolazione di Bax è evidenziata dal fatto che la sua delezione incrementa l'abilità di Bax ad oligomerizzare sul mitocondrio (Cartron et al., 2002). Non è ancora chiaro se l'attivazione di Bax avvenga nel citosol o direttamente sul mitocondrio, infatti è improbabile che il dominio BH3 di un'altra proteina della famiglia, possa da sola competere con l' $\alpha$ -elica C-terminale di Bax, per il legame alla tasca formata dai domini BH1, BH2 e BH3, quindi la dimerizzazione non può avvenire nel citosol senza la presenza di una forza che induca lo spostamento della nona  $\alpha$ -elica (Suzuki et al., 2000). Comunque l'esposizione dell'elica C-terminale ne permette l'inserzione nella membrana mitocondriale esterna lasciando esposta al solvente la tasca idrofobica, che in questa forma è potenzialmente in grado di interagire con i domini BH3 di altre molecole di Bax per formare gli omo-oligomeri responsabili del rilascio di citocromo c.

L'attivazione di **Bak** avviene esattamente nello stesso modo, con l'unica differenza che questa proteina è già presente sul mitocondrio e non deve traslocare dal citosol (Suzuki et al., 2000).

Korsmeyer e colleghi hanno osservato che, in seguito all'inserzione della forma tronca della "BH3-only protein" Bid (tBid) nella membrana mitocondriale esterna, il dominio BH3 di questa rimane esposto in superficie, dove lega temporaneamente la tasca idrofobica di Bax e/o Bak. Questa interazione promuove l'oligomerizzazione di Bax e/o Bak ed il rilascio di citocromo c dallo spazio intermembrana (Korsmeyer et al., 2000).

Le proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> possono bloccare l'attivazione di Bax e di Bak formando degli eterodimeri sulla membrana mitocondriale esterna. Infatti, peptidi formati da 16 residui aminoacidici, che mimano il dominio BH3 di Bax, sono in grado di annullare il blocco esercitato dall'overespressione di proteine anti-apoptotiche e sono capaci anche di stimolare l'apoptosi in assenza di segnali di morte (Vieira et al., 2002). È stato osservato che tali peptidi inducono la disgregazione dell'eterodimero Bcl-2/Bax e favoriscono l'interazione tra Bax e tBid e quindi la fuoriuscita di citocromo c dallo spazio intermembrana (Moreau et al., 2003).

**Gruppo III:** formato da numerose proteine contenenti soltanto il dominio BH3, le cosiddette "BH3-only proteins". Tra questi fattori, che hanno attività pro-apoptotica, vi sono Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa e Puma. Le proteine di questo gruppo funzionano come molecole di integrazione di un vasto numero di segnali pro- ed anti-apoptotici (Kaufmann and Hengartner, 2001). Regioni simili al dominio BH3 sono state trovate in alcune proteine di mammiferi (Huang and Strasser, 2000).

Questo gruppo di proteine è caratterizzato dalla presenza di un solo dominio di omologia con Bcl-2, il dominio BH3. Tale regione è un' $\alpha$ -elica anfipatica costituita da circa 16 residui aminoacidici (Chou et al., 1999).

Studi genetici hanno dimostrato come le "BH3-only proteins" siano essenziali per l'inizio del programma di morte cellulare in *C. elegans* e nel topo. In *C. elegans* una mutazione "gain of function" (gf) della "BH3-only" EGL-1 provoca la morte anormale di un gruppo di neuroni. Questo effetto è invertito da un'altra mutazione gf, stavolta a carico di CED-9, che impedisce l'interazione di tale proteina con EGL-1. Questi risultati suggeriscono che EGL-1 attivi gli effettori del programma di morte andando a legarsi e quindi disattivando la proteina anti-apoptotica CED-9 (Puthalakath and Strasser, 2002).

Nei mammiferi le "BH3-only proteins" funzionano come molecole di integrazione dei segnali di morte (intrinseci ed estrinseci) e di quelli per la sopravvivenza (Puthalakath and Strasser, 2002). La presenza di queste proteine nella cellula è regolata sia a livello trascrizionale, infatti la loro

concentrazione aumenta in modo significativo in seguito all'induzione di apoptosi, sia tramite modificazioni post-traduzionali (Cheng et al., 2001).

Per il loro diverso modo di funzionare queste molecole sono state divise in due sottogruppi:

“**Bid-like**”, ad esempio Bid e Bim, proteine capaci di attivare Bax e Bak direttamente, legandosi tramite il proprio dominio BH3. Questo sottogruppo di proteine “BH3-only” risulta sequestrato da Bcl-2 e da Bcl-X<sub>L</sub> quando queste ultime proteine sono presenti, sulla membrana mitocondriale esterna, in eccesso rispetto a Bax e a Bak (Letai et al., 2002).

“**Bad-like**”, quali Bad e Bik, proteine in grado di indurre indirettamente la formazione degli omo-oligomeri di Bax e Bak sui mitocondri. Tramite la loro interazione con Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub>, infatti, liberano tBid che era legato a queste proteine anti-apoptotiche, attivando così il rilascio di citocromo c (Letai et al., 2002).

Bad lega Bcl-2 con un'affinità circa cinque volte superiore a quella di Bid e quindi spiazzata facilmente quest'ultimo quando la sua concentrazione sui mitocondri è maggiore di quella di Bid. Ovviamente se Bcl-2 sequestra Bad sul RE, questa proteina “BH3-only” è molto meno disponibile sul mitocondrio per legare Bcl-2. A tal punto, poiché Bcl-2 rimane nell'eterodimero Bcl-2/Bid, Bid non può interagire con Bax e Bak per mediare il rilascio di citocromo c (Thomenius et al., 2003).

Tra le “BH3 only proteins”, **Bid** è di particolare interesse poiché risulta essere il bersaglio di secondi messaggeri attivati da differenti segnali di morte. Bid è normalmente presente nel citosol in forma inattiva, il taglio ad opera di alcune proteasi, quali caspasi-8, granzima B e catepsine, genera un frammento C-terminale, detto tBid. Questo trasloca sul mitocondrio (Luo et al., 1998) e qui espone in superficie il proprio dominio BH3, il quale è in grado di interagire con Bax e Bak e di indurre l'oligomerizzazione sulla membrana mitocondriale esterna (Korsmeyer et al., 2000). La struttura tridimensionale di Bid, ottenuta con la tecnica della risonanza magnetica nucleare, mostra come la proteina abbia gli stessi elementi strutturali di Bcl-2 e Bcl-x<sub>L</sub>, con due  $\alpha$ -eliche idrofobiche circondate da sei eliche antipatiche. Bid, tuttavia, a differenza delle proteine antiapoptotiche contiene un'extra  $\alpha$ -elica, tra la  $\alpha$ 1 e la  $\alpha$ 2 di Bcl-x<sub>L</sub>, così che la terza elica corrisponde al dominio BH3 di Bcl-x<sub>L</sub>. Ile 88, Leu 92, Val 95 e Met 99 in Bid sono omologhi ai residui idrofobici del peptide BH3 di Bak, che è stato visto essere importati per il legame a Bcl-x<sub>L</sub> (Sattler et al., 1997). Nella struttura di Bid Val 95 e Met 99 sono esposti mentre Ile 88 e Leu 92 sono parzialmente nascosti. In questo modo è necessario un cambiamento nella

conformazione affinché il dominio BH3 di Bid, si possa legare come il dominio BH3 di Bak a Bcl-x<sub>L</sub>. Un'altra differenza tra Bid e Bcl-x<sub>L</sub> è l'assenza di un'α-elica corrispondente alla α7; infatti in Bid la α6 è seguita dall'elica C-terminale. La posizione di questa è simile a quella dell'elica α8 in Bcl-x<sub>L</sub>. Il loop di connessione tra la seconda e la terza α-elica è molto mobile come in Bcl-x<sub>L</sub> e in esso si trovano i residui aminoacidici che vengono riconosciuti e tagliati dalle proteasi: Asp<sup>59</sup> per la caspasi-8, Asp<sup>75</sup> per il granzima B ed Arg<sup>65</sup> per gli enzimi lisosomiali (Stoka et al., 2001). Da questo quadro emerge che Bid è capace di innescare l'apoptosi in seguito a danni cellulari di vario tipo, vale a dire segnali interni ed esterni, derivanti sia dagli organelli cellulari sia dai microrganismi patogeni.

In seguito all'attivazione, Bid perde le prime due eliche e parte del loop. La prima α-elica forma interazioni idrofobiche con il dominio BH3 della proteina nativa, quindi la rimozione in seguito all'attivazione porta all'esposizione della superficie idrofobica di BH3. In questo modo tBid è in grado di interagire con Bcl-x<sub>L</sub>.

## 2.4 Autofagia

L'autofagia è uno dei principali percorsi per la degradazione e il riciclo di macromolecole e organelli intracellulari nelle cellule eucariotiche (Klionsky and Emr, 2000). Come l'Apoptosi anche l'Autofagia è un processo fisiologico, che svolge un ruolo fondamentale nel turnover di proteine, RNA e altre molecole citoplasmatiche (Seglen et al., 1991; Mortimore et al., 1996). Può agire anche come meccanismo di difesa contro l'invasione da parte di batteri o virus (Dorn et al., 2002; Kirkegaard et al., 2004). Inoltre è in grado di indurre un tipo di morte cellulare attiva, che differisce dall'apoptosi (Levine and Klionsky, 2004). L'autofagocitosi è indotta in risposta a diversi tipi di stress, come deprivazione di nutrienti e trattamenti ormonali (Lardeux and Mortimore, 1987; Van Sluijters et al., 2000). Ad esempio, in condizioni di affamamento, l'eliminazione di proteine e organelli non essenziali e il riciclo delle loro componenti può rappresentare una possibilità di sopravvivenza per le cellule. Tale processo, inoltre, risulta coinvolto in varie patologie umane (Shintani and Klionsky, 2004a), come cancro (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003; Gozuacik and Kimchi, 2004), cardiomiopatie (Ueno et al., 2004) e diverse malattie neurodegenerative come Alzheimer, Parkinson e corea di Huntington (Yuan, 2003).

L'autofagia è un processo dinamico in cui le membrane subcellulari subiscono considerevoli modificazioni morfologiche (Klionsky and Ohsumi, 1999; Kim e Klionsky, 2000). Porzioni di citoplasma, contenenti diversi organelli, vengono sequestrate all'interno di vescicole delimitate da doppie membrane, note come vacuoli autofagici o autofagosomi; tali vescicole, successivamente, si fondono con i lisosomi e il loro contenuto viene degradato e riciclato (Klionsky and Emr, 2000).

Il meccanismo che porta alla formazione dei vacuoli autofagici sembra essere non specifico, ossia porzioni di citoplasma verrebbero casualmente sequestrate all'interno degli autofagosomi. Ma esistono anche prove di un processo selettivo; ad esempio, un recente lavoro, mostra come la proteina citosolica Ald6 si ritrovi all'interno di vacuoli autofagici in quantità tali da escludere un meccanismo casuale di sequestro (Onodera and Ohsumi, 2004). Allo stesso modo, nel processo noto come pexofagia si realizza il sequestro selettivo dei perossisomi e non di altri organelli (Hutchins et al., 1999); un meccanismo analogo è stato verificato anche per i cloroplasti (Niwa et al., 2004) e probabilmente anche i mitocondri, in determinate condizioni, vanno incontro a un fenomeno di sequestro specifico all'interno di vacuoli autofagici (Xue et al., 2001). Inoltre, esistono diversi studi che mostrano come sia batteri patogeni e virus, sia proteine irregolari vengano in qualche modo identificate e degradate via autofagocitosi (Larsen and Sulzer, 2002; Kirkegaard et al., 2004). In questi ultimi casi, il meccanismo alla base della selezione del contenuto dei vacuoli autofagici non è stato ancora chiarito.

Grazie a studi condotti sul lievito *Saccharomyces cerevisiae*, è stato possibile scoprire i geni coinvolti nell'autofagia, noti come geni Atg (Matsuura et al., 1997; Reggiori and Klionsky, 2002; Klionsky et al., 2003), e descrivere i meccanismi molecolari alla base di questo processo (Noda et al., 1995; Klionsky and Emr., 2000).

Si possono distinguere diverse fasi: induzione dell'autofagia, formazione di autofagosomi, fusione con i lisosomi e degradazione del contenuto dei vacuoli autofagici.

#### **a) Induzione dell'autofagia**

L'autofagia, come accennato, è un processo che può essere regolato dalla presenza/assenza di nutrienti; in condizioni ottimali viene inibita, nel caso di affamamento viene indotta. Devono esistere, quindi, dei meccanismi che permettono di avvertire le condizioni esterne e trasdurle in un appropriato segnale intracellulare che, infine, rende possibile il controllo degli elementi alla base dell'autofagocitosi. Uno dei principali regolatori di questo processo

è la proteina chinasi Tor (“Target of rapamycin”) (Carrera, 2004), che inibisce l'autofagia in presenza di quantità basali oppure ottimali di nutrienti. Nelle cellule di animali, Tor è regolato dall'azione di un enzima noto come fosfatidilinositolo-3-OH chinasi di classe I (PI(3)K). Tale enzima viene attivato in seguito al legame di un ligando al suo recettore, come ad esempio il recettore dell'insulina (InR), la quale viene prodotta in risposta al cibo. L'attivazione della PI(3)K permette l'ancoraggio alla membrana e la conseguente attivazione della Akt/proteina chinasi B (Akt/PKB) e della 3-fosfoinositide-dipendente proteina chinasi 1 (PDK1). Tali eventi portano all'inibizione del processo autofagico (Codogno and Meijer, 2004) tramite l'attivazione di Tor, che impedisce la trascrizione dei geni alla base dell'autofagocitosi. Nelle cellule di eucarioti superiori il processo autofagico è finemente regolato e comporta l'azione di numerosi elementi come diverse chinasi, fosfatasi, proteine G eterotrimeriche e fattori di trascrizione (Talloczy et al., 2002; Codogno and Meijer, 2004; Furuta et al., 2004).

#### ***b) Formazione di autofagosomi***

In seguito all'induzione dell'autofagia, nel citoplasma cominciano a formarsi delle vescicole delimitate da doppia membrana, in questo modo diverse componenti citosoliche risultano sequestrate al loro interno (Klionsky and Ohsumi, 1999). L'origine di tali membrane non è del tutto chiara; secondo alcune osservazioni, almeno per quanto riguarda le cellule animali, sembrano derivare dal reticolo endoplasmatico (Rich et al., 2003). Il sequestro di componenti citoplasmatiche, processo non ancora del tutto chiarito, risulta essere altamente regolato dall'azione di numerose proteine. Sempre, grazie a studi sul lievito si è verificato che i fattori coinvolti nella formazione dei vacuoli autofagici comprendono due proteine ubiquitina-simili (Ubl): Atg8 e Atg12 (Ohsumi, 2001). Atg8 viene processata da una proteasi a cisteina, nota come Atg4, che opera il taglio proteolitico dell'arginina localizzata al C-terminale; questo porta all'esposizione di una glicina che permette la formazione di un legame covalente con la fosfatidiletanolammina (PE) (Ichimura et al., 2000). La formazione di Atg8-PE è resa possibile dall'azione di un enzima E1 simile, noto come Atg7 (Kim et al., 1999) e da un enzima E2 simile, noto come Atg3 (Mizushima et al., 1998). La conversione di Atg8 da proteina solubile a proteina associata a membrana (Huang et al., 2000) è di fondamentale importanza per la formazione degli autofagosomi. Nel caso di Atg12, la funzione di enzima E1 è svolta sempre da Atg7, mentre quella di enzima E2 è svolta da Atg10. Grazie all'azione di questi enzimi Atg12 viene covalentemente legata a Atg5

(Kemataka et al., 1996); una terza proteina, Atg16, si lega al coniugato Atg12-Atg5 e porta alla formazione di un complesso tetramero (Mizushima et al., 1999), importante nella fase di formazione dei vacuoli autofagici. Reazioni del tutto analoghe a quelle appena descritte si verificano anche nelle cellule di animali (Mizushima et al., 1999).

***c) Fusione con i lisosomi e degradazione del contenuto dei vacuoli autofagici***

La fusione tra la membrana esterna degli autofagosomi e quella dei lisosomi avviene grazie a diverse molecole di superficie come Vam3, Vam7, Vti1 e Ykt6 che fanno parte della famiglia delle SNARE e che sono coinvolte in fenomeni di fusione di membrane in diversi contesti cellulari (Sato et al., 1998); Ypt7, che è un membro della famiglia delle Rab GTPasi, anche queste implicate nella fusione di membrane (Kim et al., 1999); il complesso di proteine Vps di classe C (Sato et al., 2000) e numerose altre.

In seguito alla fusione, all'interno dei lisosomi si trovano vacuoli autofagici delimitati da un solo strato lipidico, che vengono detti corpi autofagici, per distinguerli dai vacuoli delimitati da una doppia membrana. Tali corpi vengono efficientemente degradati e il loro contenuto idrolizzato fino alle componenti più semplici come aminoacidi, zuccheri, acidi grassi e nucleotidi, che vengono riciclati per la sintesi di componenti essenziali. La degradazione dipende dal pH acido del lume lisosomiale e dall'azione di diversi enzimi, tra cui la proteinasi B (Nakamura et al., 1997). Altre due proteine sembrano essere coinvolte in tale fase: Atg15, che possiede una sequenza simile a quella della famiglia delle lipasi, e Atg22, proteina integrale di membrana coinvolta nella degradazione dei corpi autofagici (Teter et al., 2001).

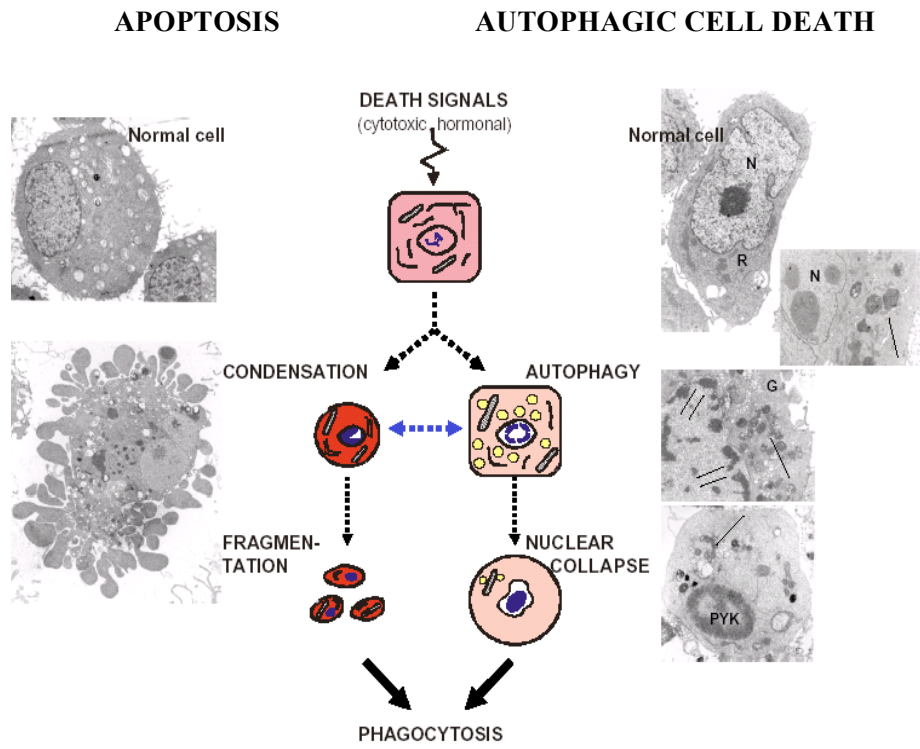


Figura IV. Schematizzazione delle due vie di morte cellulare PCD.

### 3. Transglutaminasi

Le transglutaminasi (TG) sono enzimi che negli eucarioti svolgono funzioni pleiotropiche, quali: ematopoiesi e coagulazione del sangue, spermatogenesi e formazione dell'involucro dell'uovo (corion) dopo la fertilizzazione, miofibrillogenesi, costruzione dell'epidermide e del sistema nervoso centrale e periferico. Le TG sono attive anche durante lo sviluppo del cuore, dei polmoni, delle ghiandole salivari, della cornea e in molti altri processi biologici che richiedono la formazione rapida di legami covalenti tra le proteine.

Alcune TG funzionano anche durante la formazione del citoscheletro, modulando le interazioni proteina-proteina, e durante l'apoptosi.

Il mancato funzionamento di tali enzimi può causare malattie ereditarie ed autoimmuni, nonché disordini neurodegenerativi e danni infiammatori (Lorand and Graham, 2003).

Le TG formano una famiglia di enzimi  $\text{Ca}^{2+}$  dipendenti, intra- ed extra-cellulari, che catalizzano la formazione di legami crociati tra catene polipeptidiche, in cui i gruppi  $\gamma$ -carbossi-ammidici dei residui di glutammina di un peptide fungono da donatori acilici, e gli ammino-gruppi della lisina di un'altra catena peptidica funzionano da accettori. La reazione porta alla formazione di  $\gamma$ -ammidi monosostituite dell'acido glutammico e alla liberazione di ammoniaca. La formazione di questi legami covalenti determina la comparsa di polimeri proteici, tanto stabili da resistere alla degradazione proteolitica (Rothnagel and Rogers, 1984).

Tra le proteine appartenenti a questa famiglia troviamo:

TG1, o TG epidermica (Goldsmith et al., 1974; Kim et al., 1992), TG2 o TG tissutale, TG3 (Kim et al., 1993), Banda 4.2 (Korsgren et al., 1990), TG5 o TGX (Grenard et al., 2001), TG6 o TGY (Grenard et al., 2001), Fattore XIII o TG plasmatica (Lorand and Conrad, 1984), TGp (Ho et al., 1992), TGZ (Grenard et al., 2001).

#### 3.1 Transglutaminasi 2 (TG2)

Nei mammiferi più del 90% dell'attività transglutaminasica totale è a carico della transglutaminasi 2 (TG2) (Connellan et al., 1971; Fesus and Thomazy, 1988; Piacentini et al., 1986). Questa transglutaminasi è stata

purificata per la prima volta da un omogenato di fegato, e il suo peso molecolare si aggira intorno agli 80 KDa (Ikura et al., 1988).

La TG2, abbondantemente presente in forma solubile nel citosol delle cellule (80%), compare anche nel nucleo e sull'involucro nucleare (5%) e nel plasma (15%). Inoltre può essere secreta, con un meccanismo non ancora ben chiaro, per localizzarsi preferenzialmente a livello della superficie cellulare e della matrice extracellulare (Lorand and Graham, 2003).

L'attività enzimatica della TG2, promuove la formazione di grandi complessi macromolecolari resistenti ad agenti denaturanti quali guanidina, urea e SDS (Rothnagel and Rogers, 1984), ed altamente insolubili in detergenti e agenti cootropici. La polimerizzazione dei precursori proteici conferisce anche un'elevata resistenza alla rottura meccanica e all'attacco chimico (Fesus et al., 1989; Folk, 1980), tanto che i polimeri possono essere distrutti solo tramite digestione proteolitica (Fesus et al., 1991). I residui di lisina, diammine (putrescina) e poliammine (spermidina e spermina), presenti in sequenze proteiche, possono svolgere il ruolo di accettori (Folk, 1980; Piacentini et al., 1988a; Piacentini et al., 1988b).

Oltre all'attività di "cross link", fondamentale anche per la formazione dei corpi apoptotici, la TG2 può modificare le proteine post-traduzionalmente, mediante incorporazione di ammine, acilazione o deamidazione e può anche funzionare da isopeptidasi  $Ca^{2+}$  dipendente (Fesus and Piacentini, 2002) e agire anche da proteina G.

Inoltre, esposta sul lato esterno della membrana citoplasmatica, catalizza la formazione di legami crociati tra le proteine della matrice extracellulare. È stato dimostrato che l'attività enzimatica della TG2 è cruciale per la stabilizzazione delle giunzioni dermo-epidermiche, strutture costituite da filamenti di cheratina, emidesmosomi e membrana basale, che saldano i due strati della pelle. Vari componenti della membrana basale, compresa la laminina, l'osteonectina e la fibronectina, sono stabilizzati dai legami covalenti catalizzati dalla TG2 (Trask et al., 2001). È stato osservato che l'attività della TG2 è necessaria anche per la formazione dell'osso poiché nei complessi proteici, che promuovono la nucleazione e la crescita dei cristalli di idrossiapatite, osteonectina, osteopontina, fibronectina e collagene di tipo II e XI vengono "crosslinkati" dalla TG2 (Wozniak et al., 2000).

Il contributo della TG2 all'organizzazione della matrice extracellulare è anche indipendente dalla sua attività catalitica e GTPasica. Questo enzima lega le integrine (site nella membrana plasmatica) alla fibronectina (localizzata nella matrice extracellulare), intensificando così l'adesione cellulare. Studi recenti dimostrano che la digestione della TG2, da parte delle

metalloproteasi di matrice, distrugge il pool di interazioni esistenti e promuove la metastatizzazione delle cellule tumorali (Lorand and Graham, 2003).

### 3.2 Struttura della TG2

Il gene della TG2 umana mappa sul braccio lungo del cromosoma 20 (Gentile et al., 1994), si estende per 32,5 kb e comprende 13 esoni e 12 introni (Fraij and Gonzales, 1997). La sequenza primaria della TG2 è stata determinata in fegato di cavia (Ikura et al., 1988), aorta di bovino (Nakanishi et al., 1991), macrofagi di topo e cellule endoteliali umane (Gentile et al., 1991). Questi studi hanno rivelato che la TG2 è una proteina monomerica di circa 690 aminoacidi, con un peso molecolare compreso tra 76 e 85 KDa (Aeschlimann and Paulsson, 1994). Il sito attivo è un residuo di Cys, in posizione 277 nell'uomo, localizzato nel core catalitico (Gentile et al., 1991). Questo residuo di cisteina fa parte, insieme ai residui His<sup>335</sup> e Asp<sup>358</sup>, della triade catalitica indispensabile per le reazioni acil-transferasiche (Fesus and Piacentini, 2002). La struttura tridimensionale della TG2 umana è stata determinata recentemente tramite cristallografia della proteina complessata con il GTP. Questa analisi ha permesso di identificare quattro domini distinti:

- un dominio “ $\beta$ -sandwich” all’N-terminale (da Met-1 a Phe-139);
- un “core” catalitico (da Ala-147 ad Asn-460);
- due domini “ $\beta$ -barrel” al C-terminale (il primo da Gly-472 a Tyr-583 e il secondo da Ile-591 a Ala-687 rispettivamente) (Liu et al., 2002; Yee et al., 1994).

Sembra che il dominio “ $\beta$ -sandwich” all’N-terminale contenga il sito di legame per le integrine e la fibronectina, mentre il sito di legame per il GTP è localizzato in una tasca idrofobica tra il “core” catalitico e il primo dominio  $\beta$ -barrel. Questa sequenza è codificata dall’esone 10 del gene della TG2, che presenta poche omologie di sequenza con gli esoni delle altre transglutaminasi. La triade catalitica è localizzata, invece, nel mezzo di un solco nel dominio catalitico, mentre il secondo dominio  $\beta$ -barrel contiene la sequenza di legame per la fosfolipasi C (Fesus and Piacentini, 2002).

Esistono regioni molto conservate ricche in Glu/Gln e in Asp/Asn, intorno ai residui 450 e 470, indicate come potenziali siti di legame con il Ca<sup>2+</sup> (Fesus and Piacentini, 2002). Questa ipotesi è avvalorata anche dall’analisi cristallografica, che individua il sito di legame per il Ca<sup>2+</sup> proprio

verso la parte finale del loop, che connette il dominio catalitico al primo dominio  $\beta$ -barrel (Liu et al., 2002).

### **3.3 Relazione tra espressione della TG2-apoptosi e funzione mitocondriale**

L'induzione del gene codificante per la TG2 ed il conseguente accumulo dell'enzima sono eventi rilevabili in tutti i casi in cui si osserva apoptosi, sia fisiologica (es. regressione ghiandola mammaria) che patologica (es. AIDS) (Melino and Piacentini, 1998). Inoltre, l'iperespressione della TG2 induce un aumento dei livelli di apoptosi in varie linee cellulari (Fesus et al., 1991; Piacentini et al., 1991a; Piacentini et al., 1991b), mentre l'inibizione della TG2, mediante trasfezione di cDNA antisense, rende le cellule piú resistenti a diversi stimoli apoptotici (Melino et al., 1994; Oliverio et al., 1999).

Nel corso degli ultimi anni, vari studi hanno evidenziato come la TG2 possa svolgere molteplici funzioni all'interno della cellula. Nella cascata di eventi che regolano il percorso apoptotico, oltre all'effetto stabilizzante che ha sui componenti cellulari frammentati, che finiranno nei corpi apoptotici, la TG2 potrebbe anche sensibilizzare le cellule all'apoptosi, interagendo con le molecole regolatrici delle prime fasi del processo.

Nel nostro laboratorio, per caratterizzare a livello molecolare l'effetto prodotto dall'accumulo della TG2 nelle cellule, si è trasfettata la linea cellulare di neuroblastoma umano SK-N-BE(2) con il cDNA della TG2. Le cellule così ottenute, chiamate TGA, overesprimono l'enzima in maniera costitutiva.

L'analisi morfologica di queste cellule ha mostrato come, anche in assenza di qualsiasi stimolo apoptotico, vi siano profonde variazioni nell'ultrastruttura dei mitocondri, quali ad esempio una maggiore densità elettronica della matrice mitocondriale ed un riarrangiamento delle creste. Queste differenze, inoltre, sono associate a caratteristiche funzionali specifiche: iperpolarizzazione costitutiva dei mitocondri, incremento della produzione di ROS ed abbassamento dei livelli intracellulari di GSH. L'iperpolarizzazione dei mitocondri, indotta dall'iperespressione della TG2, sensibilizza le cellule neuronali all'apoptosi e questa sensibilizzazione è indipendente dalla normale depolarizzazione dei mitocondri dovuta all'apertura dei pori PTP. Infatti, specifici inibitori di tali pori (ciclosporina A ed acido bongrechico) bloccano l'apoptosi ma non sono in grado di invertire l'iperpolarizzazione dei mitocondri nelle cellule trasfettate con la

TG2. Questa osservazione ha suggerito un coinvolgimento della TG2 nella regolazione della via mitocondriale. Infatti, le cellule che iperesprimono TG2 mostrano mitocondri iperpolarizzati ma non un aumento dei livelli di apoptosi spontanea, mentre dopo trattamento con l'induttore di apoptosi staurosporina, i mitocondri si depolarizzano molto velocemente e le cellule completano il processo apoptotico molto più rapidamente della linea cellulare parentale, la quale non esprime TG2. L'analisi dell'apoptosi, indotta in cellule TGA, ha evidenziato l'attivazione della via mitocondriale, la quale comporta il rilascio di citocromo c nel citosol e la traslocazione di AIF nel nucleo. Quindi, l'iperpolarizzazione dei mitocondri, indotta dalla TG2, non solo è indipendente dal rilascio di citocromo c ed AIF dallo spazio intermembrana dei mitocondri ma è anche un evento che precede la morte cellulare (Piacentini et al., 2002). Dal momento che circa il 30% della TG2 presente nelle cellule TGA, è localizzato sulla membrana mitocondriale esterna e poiché la TG2, causando iperpolarizzazione dei mitocondri, rende queste cellule più suscettibili agli stimoli che convergono sul mitocondrio, si è ipotizzato che la TG2 eserciti un effetto modulatore della via mitocondriale tramite interazione con una o più molecole pro- o anti-apoptiche della famiglia di Bcl-2.

### **3.4 TG2 e malattie neurodegenerative**

Numerose evidenze indicano un coinvolgimento della TG2 nella patogenesi di alcune malattie neurodegenerative, quali la corea di Huntington ed il morbo di Alzheimer (Kim et al., 1999). La corea di Huntington è caratterizzata da un punto di vista genetico dall'espansione di triplette CAG (codificanti glutamina) nell'esone 1 del gene dell'huntingtina e patologicamente dalla morte di neuroni corticali e dello striato, i quali presentano particolari inclusioni intranucleari di huntingtina, associata ad altre proteine. Il tratto di poliglutammine dell'huntingtina mutata suggeriva che questa fosse un substrato ideale per l'attività crosslinkante della TG2 (Kim et al., 1999). Molto recentemente il nostro gruppo, incrociando topi knock-out per la TG2 con un modello per la corea di Huntington, ha dimostrato che in realtà la TG2 non partecipa alla formazione degli aggregati nucleari ma risulta coinvolta nella morte selettiva dei neuroni. Infatti, i topi affetti da corea di Huntington e privi di TG2 presentano una diminuzione di morte neuronale, associata ad un miglioramento delle condizioni generali e ad una sopravvivenza maggiore.

Inoltre, le inclusioni proteiche, caratteristiche della malattia, non solo sono ancora presenti ma sono anche più numerose rispetto ai controlli (Mastroberardino et al., 2002). Gli individui affetti da morbo di Alzheimer mostrano un aumento dei livelli di espressione e di attività delle transglutaminasi, soprattutto TG1 e TG2, nei tessuti della corteccia e del cerebellum e presentano aggregati macromolecolari insolubili, che potrebbero contribuire al progressivo danno neurodegenerativo (Kim et al., 1999). Infine, evidenze sperimentali sempre più numerose indicano come la TG2 svolga più di una funzione nella cascata di eventi che conducono alla morte cellulare per apoptosi (vedi paragrafo discussione).

## 4. Corea di Huntington

La corea di Huntington (HD) è una malattia genetica, autosomica dominante, dovuta ad una mutazione del gene IT15 (Interesting Transcript 15), che codifica per una proteina di circa 350 kDa denominata huntingtina. Tale gene ha una lunghezza di 180 kb ed è costituito da 67 esoni; all'interno del primo tratto codificante è presente una sequenza trinucleotidica "CAG" ripetuta, che viene tradotta in uno "stretch" di poliglutammine (poli-Q). Il numero di triplette, nei soggetti sani, varia tra 9 e 37, mentre nei malati può spaziare in un intervallo compreso tra 38 e 86 (Reed, 1993), fino al limite massimo, finora osservato, di 250 ripetizioni.

Diversi studi hanno mostrato l'esistenza di una diretta correlazione tra la lunghezza del tratto "CAG" e il tasso di progressione dei sintomi clinici (Illarioshkin et al., 1994): maggiore è la lunghezza del tratto espanso più precoce è la comparsa dei primi segni e maggiore è la loro gravità.

La malattia è caratterizzata dalla neurodegenerazione di determinate aree del sistema nervoso centrale, come la regione dello striato e la corteccia cerebrale, dove l'htt mutata tende a formare aggregati sia a livello citosolico che nucleare.

Il malato presenta un grave quadro clinico caratterizzato da rigidità e movimenti involontari ed eccessivi, che possono interessare a caso qualsiasi segmento corporeo e che risultano più evidenti in condizioni di stress psicofisico. A poco a poco tali movimenti divengono più frequenti e fanno assumere al malato un'andatura instabile simile ad una danza (còrea), fino a condurlo ad una grave disabilità motoria che comporta una riduzione delle attività quotidiane e una perdita della capacità di pianificare ed eseguire azioni complesse (Rosenberg et al., 1995). Con il progredire della malattia possono comparire stati depressivi e di aggressività e, nel peggiore dei casi, disturbi psichici gravi quali demenza e psicosi.

L'età d'insorgenza della malattia è variabile: esistono rare forme di corea giovanile associate a sintomi più gravi e ad un decorso più rapido (Campbell et al., 1961); in questi casi la trasmissione dell'allele mutato avviene prevalentemente per via paterna (Barbeau, 1970), sembra, a causa di differenze di espressione genica dovute a diverse modalità di metilazione del gene nei due sessi (Reik et al., 1987; Marx, 1988). In altri casi la malattia non compare prima dei 60 anni; ma in media i primi segni si manifestano tra i 30 e i 40 anni (Chandler et al., 1960). La malattia progredisce lentamente,

ma inesorabilmente, fino a condurre all'invalidità totale e quindi alla morte circa 15-20 anni dopo la comparsa dei primi sintomi.

Le caratteristiche morfologiche salienti dei neuroni colpiti dalla corea di Huntington, messe in luce da uno studio del 1997, comprendono la formazione di strutture proteiche insolubili, ovvero di aggregati intracellulari a diversa localizzazione che, all'esame ultrastrutturale, appaiono come strutture sferiche fibrillo-granulari.

In particolare, è tipica la presenza di inclusioni neuronali intranucleari (NII) che, al microscopio elettronico, appaiono con una struttura fibrillare simile alle placche  $\beta$ -amiloidi dell'Alzheimer. Altre caratteristiche sono costituite da invaginazioni della membrana nucleare e dall'aumento della densità dei pori nucleari (Scherzinger et al., 1997).

La formazione di inclusi nucleari è stata osservata anche in cellule diverse dai neuroni, come ad esempio nel muscolo striato e cardiaco, nel fegato a livello di epatociti e nelle isole di Langherans del pancreas. Tutti questi organi, con il progredire della malattia, sono soggetti ad un calo di peso (Sathasivam et al., 1999). Questi dati suggeriscono che la malattia colpisce l'organismo a livello sistemico e la neurodegenerazione rappresenta l'evento più eclatante.

Nell'Huntington gli inclusi si trovano sia nel nucleo che nel citoplasma (Davies et al., 1997; Di Figlia et al., 1997; Scherzinger et al. 1997) e risultano costituiti dai frammenti della regione N-terminale dell'huntingtina mutata, generati in seguito ad un taglio proteolitico e contenenti il tratto poli-Q (Di Figlia et al., 1997).

Studi in vitro hanno dimostrato che la porzione N-terminale dell'htt è in grado di formare un maggior numero di aggregati rispetto alla proteina di lunghezza completa e che quest'ultima risulta meno tossica dell'htt frammentata (Cooper et al., 1998; Hackam et al., 1998; Martindale et al., 1998).

Il taglio proteolitico dell'huntingtina dà origine a due frammenti di diversa lunghezza: *cp-A* e *cp-B*. Gli inclusi nucleari sono costituiti dal frammento *cp-A*, mentre quelli citoplasmatici da entrambi i tipi di frammento; in realtà sia *cp-A* che *cp-B* sono in grado di entrare passivamente nel nucleo, ma *cp-B* possiede un dominio che, interagendo con delle proteine citoplasmatiche, impedisce l'attraversamento della membrana nucleare (Lunkes et al., 2002). Le proteasi che danno origine ai due frammenti appartengono alla famiglia delle endopeptidasi in grado di scindere i legami peptidici formati dall'acido aspartico (Lunkes et al., 2002), ma anche caspasi e calpaine sembrano essere coinvolte nel taglio dell'huntingtina (Kim et al.,

2001). Attraverso analisi su modelli cellulari si è visto che la formazione di aggregati si autoinnesca e che si tratta di una polimerizzazione dipendente da nucleazione, ossia non si formano polimeri finché non si raggiunge una concentrazione critica di monomero, superata la quale, dopo un intervallo di tempo, si ha formazione di polimeri. La nucleazione è lo stadio limitante del processo, la cui velocità è direttamente proporzionale al numero di triplette “CAG” e alla concentrazione della proteina (Scherzinger et al., 1999). Questo tipo di cinetica spiegherebbe, almeno in parte, l’insorgenza tardiva della malattia.

Si è ipotizzato che l’aggregazione sia dovuta alla formazione di legami idrogeno attraverso strutture polari a cerniera (polar zipper), o legami crociati (cross-links), catalizzati da enzimi denominati transglutaminasi (Green, 1993; Lorand, 1998; Mastroberardino et al., 2002) di cui ho parlato sopra.

Per quanto riguarda la patogenicità degli aggregati studi in vitro, hanno mostrato che i inclusioni e malattia, non sono necessariamente legati; esperimenti su neuroni primari in coltura trasfettati con huntingtina mutata non hanno evidenziato una correlazione tra formazione di aggregati e citotossicità. In alcuni casi è stato osservato, anche, un legame tra inclusioni nucleari e riduzione della neurodegenerazione; questo fa ipotizzare che la formazione degli inclusi nucleari, in cui viene sequestrata l’htt mutata, possa rappresentare un estremo tentativo di difesa per la cellula (Saudou et al., 1998). Questi risultati sono stati confermati anche da analisi in vivo che hanno mostrato come l’incremento delle inclusioni nucleari sia associata a un miglioramento del quadro clinico (Mastroberardino et al., 2002).

Riguardo al meccanismo in base al quale la proteina causerebbe l’insorgenza della malattia sono state formulate due teorie: secondo una, la tossicità sarebbe legata all’acquisizione di nuove funzioni da parte dell’huntingtina mutata; secondo l’altra, la patogenicità sarebbe legata ad una perdita di funzione della proteina normale.

Dai numerosi studi effettuati si può concludere che la corea di Huntington è una patologia duplice: da una parte c’è l’htt mutata che ha effetti dannosi per la cellula, dall’altra viene meno il ruolo protettivo svolto dalla proteina normale.

#### 4.1 Apoptosi e corea di Huntington

Secondo alcuni studi l'apoptosi sembra essere coinvolta anche nella corea di Huntington; ad esempio trasfettando colture primarie di neuroni striatali e ippocampali con un frammento aminoacidico rappresentante la porzione N-terminale dell'htt mutata, si è verificato che l'apoptosi rappresenta la modalità attraverso cui si ha morte neuronale. Inoltre, se nelle cellule trasfettate vengono coespressi inibitori della morte, come BclX<sub>L</sub>, non si osserva più citotossicità da poliglutammine (Sadou et al., 1998).

Studi su topi transgenici, invece, sembrano escludere un "pathway" di tipo apoptotico; infatti se da un lato i neuroni in degenerazione mostrano condensazione nucleare e citoplasmatica, dall'altro non sono mai state riscontrate caratteristiche tipiche dell'apoptosi, quali il "blebbing" di membrane e la presenza di corpi apoptotici (Iannicola et al., 2000). Inoltre, la procedura TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyltransferase-Mediated UTP End Labeling), saggio d'indagine sull'apoptosi, che evidenzia la frammentazione della cromatina, dà risultati contrastanti; ad esempio, tale saggio risulta positivo per cellule striatali prelevate da cervelli di pazienti HD (Dragunov et al., 1995; Portera-Cailliau et al., 1995; Thomas et al., 1995); d'altra parte, gli stessi esperimenti non danno risultati coerenti nel caso di neuroni striatali prelevati da topi transgenici, esprimenti l'htt mutata (Iannicola et al., 2000). Altri studi sulla morfologia dei neuroni in degenerazione, sia in modelli murini che in campioni autoptici umani, non hanno rivelato caratteristiche ultrastrutturali riconducibili all'apoptosi. Il rapido processo di morte cellulare programmata non sarebbe compatibile con la lentezza della neurodegenerazione (Turmaine et al., 2000).

Le caspasi, fondamentali protagoniste del processo apoptotico, sembrano essere coinvolte in tale patologia, infatti l'htt presenta diversi siti di taglio specifici per tali enzimi come la caspasi-3, -2 e -6 (Wellington et al., 1998). Il taglio dell'htt da parte della caspasi-3 produce frammenti N-terminali contenenti il tratto poli-Q, la cui tossicità è stata già descritta.

Numerose osservazioni hanno confermato che anomalie mitocondriali possono essere alla base di diverse malattie neurologiche, compreso il caso dell'HD (Schapira, 1997).

In relazione ad alcuni risultati, è stata avanzata l'ipotesi che l'huntingtina mutata, alla base della patogenesi dell'HD, sia in grado di danneggiare i neuroni andando a interferire direttamente con le funzioni mitocondriali (Panov et al., 2002). A tale proposito si è visto che, in modelli animali, la somministrazione di inibitori del complesso II sono in grado di riprodurre le

caratteristiche cliniche tipiche dell'HD (Tabrizi et al., 1999 ). Gli stessi risultati si ottengono con la tossina mitocondriale 3NP (acido 3-nitropropionico), che è in grado di riprodurre gli aspetti neurologici dell'HD umana (Sipione and Cattaneo, 2001; Rubinsztein, 2002).

E' stato dimostrato che ad alterare l'attività mitocondriale è proprio l'htt mutata e non quella wild-type. I mitocondri, isolati da linfoblasti di pazienti, hanno mostrato una rapida depolarizzazione in risposta ad una riduzione della quantità di  $Ca^{2+}$ , questo dato è stato confermato anche con mitocondri isolati da cervelli di topi transgenici (Panov et al., 2002). Questi ultimi, analizzati al microscopio elettronico, hanno mostrato che l'htt mutata si trova associata alla membrana mitocondriale dei neuroni; tale interazione sembra causare un'apertura anomala dei PTP (Permeability Transition Pore) attraverso i quali possono fluire verso il citosol diversi ioni, tra cui quelli  $Ca^{2+}$  (Panov et al., 2002). L'alterazione dell'omeostasi del calcio può causare un'attivazione delle caspasi che, infine, conducono all'apoptosi. In tale contesto, si può verificare l'attivazione di altri enzimi calcio-dipendenti come le calpaine, responsabili della proteolisi di vari polipeptidi, compresa la stessa htt wild-type (Kim et al., 2001), che svolge, come già detto, un'importantissima funzione protettiva sui neuroni (Rigamonti et al., 2000).

In base a tali risultati, non si può affermare con certezza che l'apoptosi sia il meccanismo di morte alla base dell'HD, anche se le caspasi, enzimi che svolgono un ruolo fondamentale nel processo di morte cellulare programmata, sono ampiamente coinvolte in tale patologia.

#### **4.2 Autofagia e corea di Huntington**

In base a diverse osservazioni, si è cominciato a pensare all'autofagia come meccanismo alternativo di morte attiva nel caso di alcune malattie neurodegenerative, compresa la corea di Huntington (Yuan et al., 2003). Nel caso dell'HD si osserva, infatti, un incremento della presenza di autofagosomi a livello neuronale (DiFiglia et al., 1995; Sapp et al., 1997). L'espressione in vitro dell'htt mutata porta alla formazione di vacuoli autofagici htt-positivi (Kegel et al., 2000); questo fa ipotizzare un coinvolgimento di tale proteina nell'induzione del processo autofagico. Studi in vivo confermano un incremento di autofagia in cellule striatali di topi HD in seguito a stress ossidativo (Petersen et al., 2001).

Ulteriori analisi hanno dimostrato che la degradazione del frammento N-terminale dell'htt mutata avviene attraverso un meccanismo di autofagocitosi

(Ravikumar et al., 2002). Un recente lavoro ha messo in luce come la presenza di aggregati possa promuovere l'eliminazione dell'htt mutata andando ad attivare il processo autofagico grazie al sequestro, negli aggregati stessi, di mTOR, regolatore negativo dell'autofagia (Ravikumar et al., 2004). Altri lavori hanno mostrato che l'autofagia può facilitare la degradazione e l'eliminazione dell'htt mutata anche attraverso l'attivazione di enzimi quali caspasi e calpaine (Qin et al., 2003). D'altra parte un'eccessiva stimolazione di enzimi come le caspasi, associata ad un'alterata e/o insufficiente proteolisi, può aumentare la presenza di frammenti N-terminali (Qin et al., 2004), che, come già detto, sono in grado di interferire con diverse funzioni cellulari.

Nelle fasi iniziali della malattia, l'autofagia sembra avere una funzione positiva promuovendo l'eliminazione dei frammenti N-terminali dell'htt mutata ed evitando, così, la loro attività citotossica. D'altra parte, in fasi tardive, un'eccessiva stimolazione del processo autofagico potrebbe divenire dannoso per la cellula in quanto responsabile della compromissione di interi organelli.

In conclusione, il legame tra autofagia e HD potrebbe essere dovuto ad un'eccessiva attivazione di enzimi come le caspasi associata ad una inefficiente proteolisi; ad alterazioni a livello di localizzazione e/o funzione di organelli come i mitocondri e ad una conseguente morte cellulare programmata (Qin et al., 2004).



## **SCOPO DELLA TESI**



Durante l'apoptosi mitocondrio-mediata, sui mitocondri convergono segnali sia estrinseci sia intrinseci, che inducono il rilascio di fattori proteici dallo spazio intermembrana al citosol, dove sono richiesti per l'attivazione delle caspasi (Green and Kroemer, 2004). Questi eventi sono associati con l'alterazione delle funzioni mitocondriali, inclusa la perdita del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) (Reed and Kroemer, 2000), che si osserva anche durante l'autofagia. Nell'autofagia, infatti, la depolarizzazione della membrana mitocondriale è seguita dalla cattura di questi organelli negli autofagosomi (Elmore et al., 2001). Pertanto, la perdita del MMP può rappresentare o un evento precoce nell'apoptosi o un segnale associato all'autofagocitosi dei mitocondri (Rodriguez-Enriquez et al., 2004).

In precedenti lavori è stato dimostrato che la Transglutaminasi 2 (TG2), ampiamente descritta nell'introduzione, è uno dei pochi geni che sono indotti durante l'apoptosi (Fesus and Piacentini, 2002), inoltre è stato visto la TG2 si localizza sui mitocondri e che la sua iperespressione porta a evidenti alterazioni mitocondriali (Piacentini et al., 2002).

Nonostante si abbiano tutte queste informazioni, relative alla relazione tra espressione della TG2, alterazioni mitocondriali ed apoptosi, la precisa posizione di questo enzima, nella cascata di eventi che inducono la cellula a morire, non è stata ancora completamente chiarita. Quindi, lo scopo di parte della tesi di dottorato è stato quello di verificare, a livello molecolare, quali siano le eventuali interazioni tra la TG2, che durante l'apoptosi è abbondantemente presente sui mitocondri, e le proteine implicate nella regolazione della via mitocondriale dell'apoptosi. L'analisi della sequenza primaria della proteina ha portato all'identificazione di un dominio della TG2, il quale presenta un'elevata omologia col dominio BH3 delle proteine della famiglia di Bcl-2 a cui appartengono proteine che controllano l'omeostasi mitocondriale e mediano il rilascio dei fattori pro- ed anti-apoptotici dai mitocondri. Il ruolo biologico di questo dominio è stato studiato mediante l'uso di peptidi che lo mimano, i quali hanno portato all'identificazione di Bax quale interattore della TG2 a livello mitocondriale.

Contemporaneamente il nostro gruppo si è occupato dello studio del possibile coinvolgimento della TG2 come modulatore della morte cellulare, nella corea di Huntington (HD). Infatti, è noto che, mentre la sovraespressione della TG2 nelle cellule neuronali, favorisce la morte cellulare, inducendo alterazioni mitocondriali e stress ossidativo (Piacentini et al., 2002), l'incrocio di topi transgenici (HD) R6/1 con topi knock out per la TG2, porta ad una ridotta morte cellulare, un significativo miglioramento dei movimenti ed una sopravvivenza prolungata (Mastroberardino et al.,

2002). Ciò è comunque indipendente dalla capacità della TG2 a formare le inclusioni intranucleari mediante l'attività transglutaminasica (Bailey and Johnson, 2005).

Nell'Huntington la causa del processo degenerativo, sono l'acquisizione di funzione tossica da parte dell'huntingtina mutata e la perdita di funzione protettiva da parte della proteina normale. Entrambi questi eventi, come già descritto nell'introduzione, portano a numerose alterazioni cellulari, che coinvolgono anche i mitocondri. Tali alterazioni mitocondriali possono, in alcuni casi, portare a morte cellulare, che può manifestarsi sia come apoptosi che come autofagia.

Quindi, alla luce di quanto detto, nella seconda parte della tesi, mi sono occupata dello studio del ruolo delle evidenti alterazioni mitocondriali che si osservano nelle cellule HD.

Per gli esperimenti riportati in questa tesi, si è utilizzato un sistema cellulare rappresentato da linfociti ottenuti da pazienti HD e immortalizzati con il virus Epstein-Barr; infatti l'huntingtina, proteina ubiquitaria, viene espressa anche in queste cellule. I linfoblasti presentano alcune delle caratteristiche osservate nei neuroni HD, come proteolisi dell'htt mutata, alterazioni mitocondriali e vacuoli autofagici; d'altra parte, non essendo interessati dal processo degenerativo, permettono un'analisi diretta degli effetti dell'htt mutata rispetto a quella wild-type. Le linee cellulari sono state ottenute sia da pazienti eterozigoti sia da omozigoti. Studi recenti, focalizzati sulla ricerca di differenze tra eterozigoti e omozigoti, hanno evidenziato una più rapida progressione della malattia per questi ultimi (Squitieri et al., 2003). Tale differenza potrebbe essere dovuta al fatto che, negli omozigoti, l'htt mutata è presente in doppia dose e il ruolo protettivo svolto dall'htt normale viene a mancare completamente.

In questa tesi sono state analizzate le diverse vie di morte cellulare e le alterazioni mitocondriali nella corea di Huntington, attraverso uno studio comparativo tra eterozigoti e omozigoti.

## **MATERIALI E METODI**



## 1. Analisi della sequenza consensus BH3 vs TG2

La sequenza consensus per il dominio BH3 è stata trovata in Prosite (<http://expasy.org/prosite/S01259>), banca dati dei domini conservati di varie proteine. Successivamente è stata confrontata la sequenza primaria della proteina TG2, trovata anch'essa nello stesso sito (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-de>) con la consensus ([LIVAT] - x(3) - L - [KARQ] - x - [IVAL] - G - D - [DESG] - [LIMFV] - [DENSHQ] - [LVSHRQ] - [NSR]), al fine di identificare un'eventuale omologia.

## 2. Trasfezioni e colture cellulari

La linea cellulare SK-N-BE(2), che non esprime a livelli rivelabili la Transglutaminasi 2 (TG2), deriva da una biopsia effettuata su un bambino affetto da neuroblastoma diffuso. Il clone TGA, che iperesprime la TG2, è stato ottenuto da esperimenti di trasfezione eseguiti precedentemente utilizzando la metodica del fosfato di calcio (Melino et al., 1994). Le cellule TGA sono state selezionate per mezzo di cotrasfezione stabile delle cellule SK-N-BE(2) con il costrutto pSV2Neo, contenente la resistenza alla neomicina, e con quello pSG5-TG2, che contiene il cDNA della TG2 nella sua completa lunghezza (3.3 Kb).

Entrambe le linee cellulari sono cresciute in terreno di coltura Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, GIBCO), addizionato di L-glutamina 2 mM, penicillina 100 i.u./ml, streptomicina 100mg/ml (Sigma) e siero fetale di vitello (GIBCO), inattivato a 58°C, ad una concentrazione del 10%. Le cellule sono state incubate a 37°C, in atmosfera umida al 5% (v/v) di CO<sub>2</sub>.

## 3. Peptidi sintetici

I peptidi sono stati sintetizzati dalla Sigma Genosis, ad una purezza maggiore del 90% (HPLC) e controllati per mezzo di spettrometria di massa.

I peptidi presentano la seguente sequenza:

ANT: Biot-RQIKIWFQNRRMKWKK

ANT-BH3TG2: Biot-RQIKIWFQNRRMKWKKDVNOKFLKNAGRDCSR

ANT-BH3Bax: Biot-RQIKIWFQNRRMKWKKKLLSECLKRIGDELDS

Tutti i peptidi prima di essere usati sono stati risospesi in DMSO alla concentrazione 1mM.

#### 4. Studio della morte cellulare e dell'apoptosi

Il saggio della morte cellulare delle cellule SK-N-BE(2), trattate con i 3 peptidi e con Staurosporina (STS, Sigma), è stato eseguito utilizzando un metodo colorimetrico (CellTiter Proliferation Assay, Promega). Questo metodo colorimetrico permette di determinare il numero di cellule rimaste vitali e il numero di cellule morte dopo un trattamento. Il reagente per il saggio contiene il composto del tetrazolio MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfufenil)-2H-tetrazolio, sale interno) ed il reagente elettronico accoppiato PES (fenazina etosolfata). Il composto MTS viene ridotto dalle cellule vitali in un prodotto colorato solubile, questa conversione è accompagnata dalla produzione di NADPH o NADH ad opera di deidrogenasi delle cellule metabolicamente attive. Le cellule sono state seminate ( $1-2 \times 10^4$ ) in piastre da 96 pozzetti, in 0,2 ml di terreno completo. Dopo 24 h sono state lavate con terreno (con e senza FCS) e trattate con i peptidi (50 $\mu$ M) e con STS. Per la determinazione della morte cellulare, ai tempi indicati, sono stati aggiunti 20 $\mu$ l di reagente alle cellule, che sono state successivamente incubate per 1-4 h a 37°C in atmosfera umida di CO<sub>2</sub> al 5%. Per misurare la quantità di prodotto colorato, rilasciato dalle cellule vitali, è stata registrata l'assorbanza a 490nm allo spettrofotometro.

L'apoptosi, indotta nelle cellule SK-N-BE(2) dal trattamento con i peptidi con e senza ciclosporina A, è stata valutata per mezzo di citometria a flusso dopo doppia colorazione con annessina V coniugata con il fluorocromo FITC (fluorescina-isotiocianato) e ioduro di propidio (PI). L'annexina V, in presenza di ioni Ca<sup>++</sup> è in grado di legare selettivamente la PS, amminofosfolopide normalmente presente solo nel foglietto interno della membrana plasmatica, il quale, durante le fasi iniziali del processo apoptotico, viene esposto sulla superficie esterna della membrana. Lo ioduro di propidio è un intercalante del DNA.

Le cellule sono state seminate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> in terreno completo e dopo 24 h trattate con i peptidi con e senza Ciclosporina A (CsA, Sigma). La CsA è stata aggiunta prima del trattamento con i peptidi ad una concentrazione 1 mM per 15 minuti. Dopo i trattamenti le cellule sono state staccate, lavate due volte nello specifico tampone contenente Ca<sup>++</sup> e centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti; in seguito sono state risospese in un volume standard (500  $\mu$ l) dello stesso tampone a cui sono stati aggiunti 5  $\mu$ l di annessina V-FITC e 5  $\mu$ l di PI e incubate a temperatura ambiente al buio per 5'. Quindi, sono state analizzate utilizzando un citofluorimetro a flusso FACScan (Becton-Dickinson). La fluorescenza è stata misurata tra 565 e 605

nm e sono stati acquisiti almeno 10000 eventi. Questi sono stati analizzati utilizzando il programma CellQuest. Tutti i dati riportati rappresentano il valore medio di almeno quattro esperimenti separati  $\pm$  la deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando Student's *t*-test. Solo i valori inferiori a 0.01 sono stati considerati significativi.

## 5. Misura del potenziale della membrana mitocondriale

Il potenziale della membrana mitocondriale ( $\Delta\psi_m$ ) è stato valutato con tecniche citofluorimetriche utilizzando una sonda fluorescente: lo ioduro 5,5',6,6'-tetracloro-tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1, Molecular Probes). JC-1 è un colorante metacromatico che, sensibile alle variazioni di voltaggio, è in grado di cambiare, in modo reversibile, la sua lunghezza d'onda d'emissione al variare del  $\Delta\psi_m$ . Questa proprietà è dovuta alla formazione di aggregati in seguito all'incremento del  $\Delta\psi_m$  che provoca uno spostamento della lunghezza d'onda della fluorescenza emessa da 530nm (JC-1 monomeri, verde) a 590nm (JC-1 aggregati, rosso) quando la molecola viene eccitata a 590 nm. L'utilizzo di questa sonda in citofluorimetria permette sia studi qualitativi (considerando lo spostamento dal verde al rosso), che quantitativi (considerando l'intensità della fluorescenza).

Le cellule, dopo 1 h di trattamento con il peptide, con e senza CsA, sono state incubate con JC-1 10  $\mu$ M per 15 minuti a 37°C al buio e, infine, analizzate al citofluorimetro FACScan (Becton-Dickinson). Per valutare i cambiamenti del potenziale di membrana mitocondriale, i parametri dello strumento sono stati settati su cellule di controllo non trattate, quindi sono stati acquisiti gli altri campioni usando gli stessi parametri.

## 6. Immunofluorescenza

Le cellule SK-N-BE(2) sono state trattate con il peptide TG2-BH3 50  $\mu$ M per 1 h, sono state lavate 1 volta in PBS e fissate in paraformaldeide al 4%/acido picrico allo 0.19%. Dopo il fissaggio sono state risciacquate 3 volte con PBS e permeabilizzate con 0.1% SDS (o TX-100) in PBS per 10' a temperatura ambiente.

Le cellule sono state lavate 3 volte con PBS e bloccate per 20' in FBS al 10% in PBS 0.1% SDS.

Per l'immunofluorescenza indiretta, sono stati usati gli anticorpi primari: anti-Bax (N-20,  $\mu\text{g/ml}$ ; 6A7  $\mu\text{g/ml}$ ) e anti-Hsp60 (SPA-806, 1  $\mu\text{g/ml}$ , StressGen). Come anticorpi secondari sono stati utilizzati anticorpi coniugati al fluorocromo dell'Alexa (Molecular Probes). Prima di montare i vetrini per l'osservazione al microscopio, è stata eseguita la marcatura con il colorante Hoechst 33342 (Molecular Probes). I campioni sono stati osservati al microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TE200, munito di telecamera Coolsnap CCD.

### **7. Analisi del rilascio del citocromo c in cellule vitali e mitocondri isolati**

Le cellule SK-N-BE(2) sono state seminate il giorno prima in terreno RPMI in piastre da 6 pozzetti ( $10^6$  cellule per pozzetto), alle cellule sono stati forniti i peptidi in concentrazione 50  $\mu\text{M}$ . Ai tempi indicati le cellule sono state staccate e raccolte, quindi sono state lavate una volta in PBS 1X e incubate per 10' in ghiaccio con buffer ipotonico (2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, con una miscela di inibitori delle proteasi, Roche). Un volume uguale di buffer per l'omogenizzazione dei mitocondri 2X (450 mM saccarosio, 10 mM TES, 400  $\mu\text{M}$  EGTA pH 7.2, 2 mM DTT) è stato aggiunto ai campioni che poi sono stati omogenati (50 strokes potter) a 4°C. Il lisato cellulare è stato centrifugato due volte (10', 900 g, 4°C) per rimuovere i nuclei e le cellule intatte, e il surnatante è stato centrifugato una volta (15', 17000 g, 4°C) per recuperare il pellet mitocondriale.

L'analisi del rilascio del citocromo c è stata condotta mediante Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale anti-cytc (65981A, BD PharMingen); come controllo della bontà della frazione mitocondriale è stato usato l'anticorpo che riconosce la citocromo c ossidasi mitocondriale (anti-COX, 20E8-C12, Molecular Probes).

### **8. Trattamento dei mitocondri coi peptidi**

Il pellet di mitocondri è stato risospeso in 500  $\mu\text{l}$  di swelling buffer 1X (0,1 M saccarosio, 0,5 M succinato di sodio, 50 mM EGTA pH 7.4, 1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,5 M MOPS, 2mM rotenone), tenuto in ghiaccio e usato entro 2 h dalla preparazione. I mitocondri (1mg proteine/ml) così ottenuti, sono stati trattati con i peptidi ad una concentrazione di 10 e 50  $\mu\text{M}$ , in presenza e assenza di CsA 5  $\mu\text{g/ml}$  per 20' a temperatura ambiente. Successivamente si è eseguita

una centrifugazione a 10000 X g, 10' a 4°C. Le proteine contenute nel supernatante, sono state concentrate e analizzate per Western Blot, utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-cytc.

### **9. Coprecipitazioni**

I mitocondri (0,5 mg), isolati dalle cellule SK-N-BE(2), sono stati trattati con peptidi TG2-BH3 e Bax-BH3, biotinilati all'estremità N-terminale, alle concentrazioni 5 e 10 µM, per 20' a temperatura ambiente. Successivamente sono stati centrifugati a 10000g per 10' e a 4°C, per eliminare il surnatante. Il pellet è stato lisato con CHAPS-IP buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 150 Mm KCl, 1% CHAPS) per 30' in ghiaccio. 50 µl di sferette di avidina prelavate sono state aggiunte al lisato ed il tutto è stato incubato, agitando gentilmente, per 2 ore a 4°C. Successivamente le sferette sono state lavate 6 volte (600 X g, 5', 4°C). Le proteine attaccate alle sferette sono state solubilizzate nel buffer Laemmli e rivelate tramite Western blot con l'anticorpo anti-Bax policlonale (N-20, Santa Cruz Biotechnology).

### **10. Immunoprecipitazioni**

Le cellule TGA sono state seminate in terreno RPMI con siero, il giorno dopo sono state trattate e non con STS 1µM per 2 h, quindi tripsinizzate e lavate 2 volte con PBS freddo. Il pellet di cellule ottenuto è stato risospeso in CHAPS-IP, 30' in ghiaccio, per indurre la rottura delle membrane, quindi si è centrifugato a 14000 X g a 4°C per 10'. Per effettuare le immunoprecipitazioni abbiamo utilizzato le Dynabeads Proteina G. 500 µg di proteine totali sono state preincubate con 50 µl di Dynabeads-proteina G (Dyna), lavate precedentemente, per 1h a 4°C in agitazione. Successivamente mediante un magnete, si sono allontanano le Dynabeads, si sono aggiunti 5 µg di anticorpo anti-TG2 monoclonale (Neomarkers, CUB 7402), anti-Bax N-20 policlonale (Santa Cruz), anti Bax 6A7 monoclonale (BD-Pharmingen) e di nuovo 50 µl di Dynabeads-proteina G (Dyna), lavate precedentemente. Dopo un incubazione di 4 h o o.n. le beads sono state recuperate con il magnete e lavate 6 volte con CHAPS-IP buffer. Le proteine immunoprecipitate, sono state staccate dalle beads bollendo in Sample Buffer, corse su gel 4-12% Nu-PAGE (Invitrogen) e rivelate tramite Western Blot con gli anticorpi anti-TG2 (0,2 µg/ml), anti-Bax

(N-20, 0,2µg/ml; 6A7, 1 µg/ml) e anti-Bax (0,2 µg/ml (Neomarkers, CUB 7402)).

### **11. Analisi delle proteine substrato della TG2**

Le cellule TGA sono state cresciute in presenza di 5 mM 5-(biotinamide)pentilamina (EZ-link, Pierce) e trattate con STS 1µM, per 2 h, in presenza o assenza dell'inibitore delle caspasi benzyloxycarbonil-val-ala-dl-aspartil-fluoro-methylketone (zVAD-FMK, Promega) 100 µM. Successivamente le cellule sono state staccate, raccolte e lisate con il buffer CHAPS-IP. I substrati della TG2 biotinilati sono stati separati su gel 4-12% Nu-PAGE. Dopo il trasferimento sulla nitrocellulosa, i substrati della TG2 sono stati rivelati mediante streptavidina coniugata alla perossidasi (Amersham Biosciences). I mitocondri dalle stesse cellule sono stati isolati e dopo la lisi in CHAPS IP buffer, i substrati della TG2 sono stati isolati mediante particelle paramagnetiche di streptavidina (MagneSphere, Promega). Le proteine sono state corse su gel 4-12% Nu-PAGE e rivelate tramite Western Blot con l'anticorpo anti-Bax N-20.

### **12. Colture cellulari linfoblastoidi**

Le linee cellulari sono linfoblasti umani gentilmente concessi dalla Neurogenetics Unit of IRCCS Neuromed di Isernia. I linfoblasti sono stati ottenuti attraverso l'immortalizzazione, con il virus Epstein Barr, di linfociti prelevati da sangue periferico.

La linea HD2304 è stata ottenuta da un volontario sano e costituisce il controllo, il numero di triplette CAG a livello del gene IT15 è inferiore a 36; la linea HD-HE48 è costituita da linfoblasti HD eterozigoti con un numero di ripetizioni CAG pari a 48; la linea HD-HE100 rappresenta linfoblasti HD eterozigoti overespansi (numero di triplette CAG superiore a 100); infine la linea HD-HO42/50 costituisce linfoblasti HD omozigoti caratterizzati da un numero di ripetizioni CAG compreso tra 42 e 50.

Le cellule sono state cresciute in terreno di coltura Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, GIBCO), addizionato di L-glutamina 2 mM, penicillina 100 i.u./ml, streptomina 100mg/ml (Sigma) e siero fetale di vitello (GIBCO), inattivato a 58°C, ad una concentrazione del 10%. Le cellule sono state incubate a 37°C, in atmosfera umida al 5% (v/v) di CO<sub>2</sub>.

### **13. Induzione e analisi della morte cellulare**

Per l'analisi della morte cellulare al citofluorimetro, i linfoblasti sono stati seminati in piastre da coltura alla concentrazione di  $5 \times 10^5$ /ml in terreno RPMI e sono stati sottoposti ai seguenti stimoli :

1. 1  $\mu$ M STS per 18 h
2. privazione di nutrienti: le cellule sono state cresciute in terreno RPMI privo di siero fetale di vitello (GIBCO) per 72 ore al fine di indurre autofagia.

Le cellule così trattate e quelle di controllo non trattate, sono state sottoposte a preincubazione con 50  $\mu$ M di inibitore delle caspasi (zVAD-FMK, Chemicon International, Temecula, CA, USA) e con 10 mM di inibitore di autofagia 3 metil-adenina (3-MA, Sigma). La morte cellulare è stata valutata per mezzo della citometria a flusso dopo doppia colorazione con annessina V coniugata con il fluorocromo FITC (fluorescina-isotiocianato) e ioduro di propidio (PI). I campioni sono stati acquisiti mediante un citofluorimetro FACScan (Becton-Dickinson) e analizzati utilizzando il programma CellQuest.

### **14. Microscopia elettronica**

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) permette lo studio dei dettagli ultrastrutturali di un campione biologico.

Le cellule sono state fissate in glutaraldeide 2.5% per 2 h e  $\text{OsO}_4$  1% in tampone cacodilato (0.2M, pH 7.2) per 1 h; in seguito sono state disidratate mediante un gradiente di etanolo e infiltrate con una resina epossidica (Agar Aids, Cambridge), che viene fatta polimerizzare a 65°C per 48 h. Grazie all'utilizzo di particolari strumenti denominati ultramicrotomi si ottengono delle sezioni ultrasottili (tra 60 e 100 nm), che vengono contrastate con acetato di uranile al 2% in acqua distillata per 40' al buio e con citrato di piombo per 5' in ambiente anidro. A questo punto le sezioni possono essere osservate e fotografate tramite il microscopio elettronico a trasmissione (Philips EM208S).

### **15. Misura del potenziale della membrana mitocondriale**

Il potenziale della membrana mitocondriale ( $\Delta\psi_m$ ) è stato valutato con tecniche citofluorimetriche utilizzando la sonda JC-1 come descritto sopra.

Le cellule, alla concentrazione di  $5 \times 10^5$ , trattate come descritto sopra, sono state incubate con JC-1  $10 \mu\text{M}$  per 15 minuti a  $37^\circ\text{C}$  al buio e, infine, analizzate al citofluorimetro FACScan (Becton-Dickinson). Per valutare i cambiamenti del potenziale di membrana mitocondriale, i parametri dello strumento sono stati settati su cellule di controllo non trattate, quindi sono stati acquisiti gli altri campioni usando gli stessi parametri.

### **16. Microscopia a fluorescenza**

La monodansilcadaverina (MDC) è una sostanza autofluorescente in grado di marcare selettivamente gli autofagosomi.

I linfoblasti sono stati incubati con MDC (Sigma)  $50 \mu\text{M}$  in PBS per  $10'$  a  $37^\circ\text{C}$ . I compartimenti acidi invece, sono stati marcati utilizzando il Liso Tracker Red (LTR, Molecular Probes), una sonda fluorescente in grado di marcare specificamente compartimenti dal contenuto acido come i lisosomi.

Il LTR è stato aggiunto al terreno di coltura alla concentrazione finale di  $1 \mu\text{M}$  per  $15'$  a  $37^\circ\text{C}$ . In seguito il pellet di cellule è stato fissato con paraformaldeide al 4% per 1 h a temperatura ambiente. Dopo essere stato lavato con PBS, sono stati allestiti dei vetrini utilizzando il Cytospin (Shandon Cytospin 4 Control) a 1300 rpm per  $10'$ . I vetrini sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza (Nikon Microphot).

## **RISULTATI (I PARTE)**



## 1. Identificazione ed analisi del dominio BH3 della TG2

Il rilascio di citocromo c dallo spazio intermembrana dei mitocondri è mediato dai membri pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2, in particolare da Bax e Bak. Le interazioni che queste due proteine stabiliscono sia con i membri anti-apoptotici, Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>, sia con le “BH3 only proteins”, Bid/Bad/Bim/ecc, modulano la loro attivazione, la formazione dei pori sulla membrana mitocondriale esterna e la depolarizzazione dei mitocondri. Queste interazioni proteina-proteina avvengono tramite il dominio BH3, comune a tutte le proteine della famiglia di Bcl-2 (Huang and Strasser, 2000).

Le alterazioni mitocondriali osservate nelle cellule overesprimenti TG2, così come l'abbondanza dell'enzima a livello mitocondriale, ci hanno indotto ad ipotizzare un possibile ruolo della TG2 nella modulazione dell'attività di una o più proteine della famiglia di Bcl-2. Tenendo presente il fatto che le interazioni tra queste proteine avvengono attraverso il dominio BH3, abbiamo analizzato la sequenza primaria della TG2 per verificare l'eventuale presenza di un dominio di questo tipo. L'analisi al computer, effettuata utilizzando la consensus per il dominio BH3 presente in banca dati (Prosite), ne ha confermato l'esistenza, infatti è stata identificata una regione di 15 aminoacidi, la quale presenta il 70% di omologia con il dominio BH3. La **Figura 1a** riporta l'allineamento della sequenza aminoacidica del dominio presente nella TG2, con quella dei domini BH3 di alcune proteine della famiglia di Bcl-2; si possono evidenziare delle caratteristiche importanti:

- la sequenza del putativo dominio BH3 della TG2 differisce dalla consensus solo in tre aminoacidi: asparagina 200, arginina 209 e cisteina 211;
- la leucina in posizione 204, che sembra essere determinante per l'interazione BH3-mediata tra le proteine della famiglia di Bcl-2 (Moreau et al., 2003; Huang and Strasser, 2000; Wang et al., 1998), è conservata;
- il putativo dominio BH3 della TG2, per composizione aminoacidica, risulta più simile a quello di Bcl-2 che non a quello delle altre proteine della famiglia di Bcl-2, lasciando supporre un'interazione con i membri pro-apoptotici, Bax e/o Bak, piuttosto che con quelli anti-apoptotici, Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> (Letai et al., 2002).

Inoltre, l'analisi della posizione del dominio BH3 rispetto alla struttura tridimensionale della TG2 (**Figura 1b**), indica come il dominio, formato da

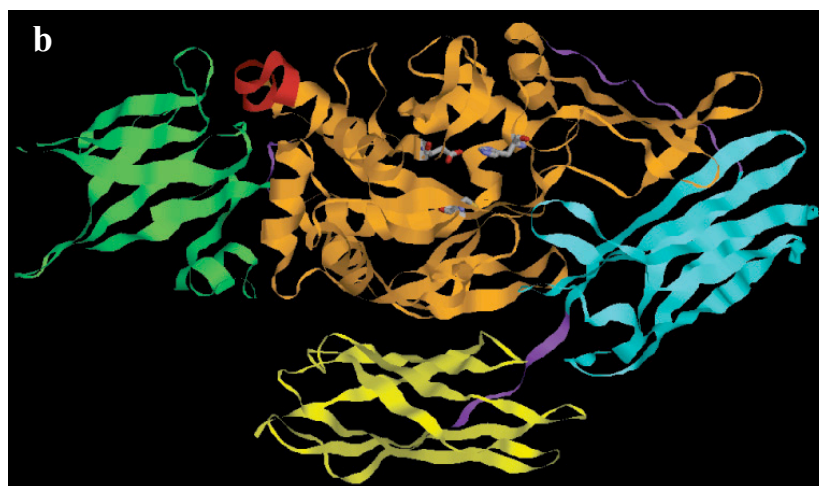
due  $\alpha$ -eliche in orientamento opposto, sia esposto al solvente e quindi potenzialmente in grado di interagire con altre proteine.

**a**

<b>TG2</b>	<b>200</b>	<b>NPKFLKNAGRDCSRR</b>	<b>214</b>
<b>Bcl-2</b>	<b>93</b>	<b>VHLTLRQAGDDFSRR</b>	<b>107</b>
<b>Bcl-xL</b>	<b>86</b>	<b>VKQALREAGDEFELR</b>	<b>100</b>
<b>Bax</b>	<b>59</b>	<b>LSECLKRIGDELDSN</b>	<b>73</b>
<b>Bak</b>	<b>74</b>	<b>VGRQLAIIIGDDINRR</b>	<b>88</b>
<b>Bid</b>	<b>86</b>	<b>IARHLAQIGDEMDHN</b>	<b>100</b>

<b>LxxxLKxIGDDLsRR</b>			
<b>I</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>EINLN</b>
<b>V</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>SMEVS</b>
<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>L</b>	<b>GFDS</b>
<b>T</b>			<b>VHH</b>
			<b>QQ</b>



**Figura 1. (a)** Allineamento di sequenza tra il dominio BH3 della TG2 e quello della famiglia Bcl-2. In giallo sono evidenziati gli otto amminoacidi conservati. Sequenza consenso da Prosite. **(b)** Struttura tridimensionale della TG2, il dominio BH3 (in rosso), si trova nel “core” catalitico (arancione) della proteina ed è strutturato in due  $\alpha$ -eliche in orientamento opposto. In verde, il dominio “ $\beta$ -sandwich” all’N-terminale, in blu e in giallo i due domini “ $\beta$ -barrel” al C-terminale.

## 2. Il peptide TG2-BH3 induce morte cellulare per apoptosi

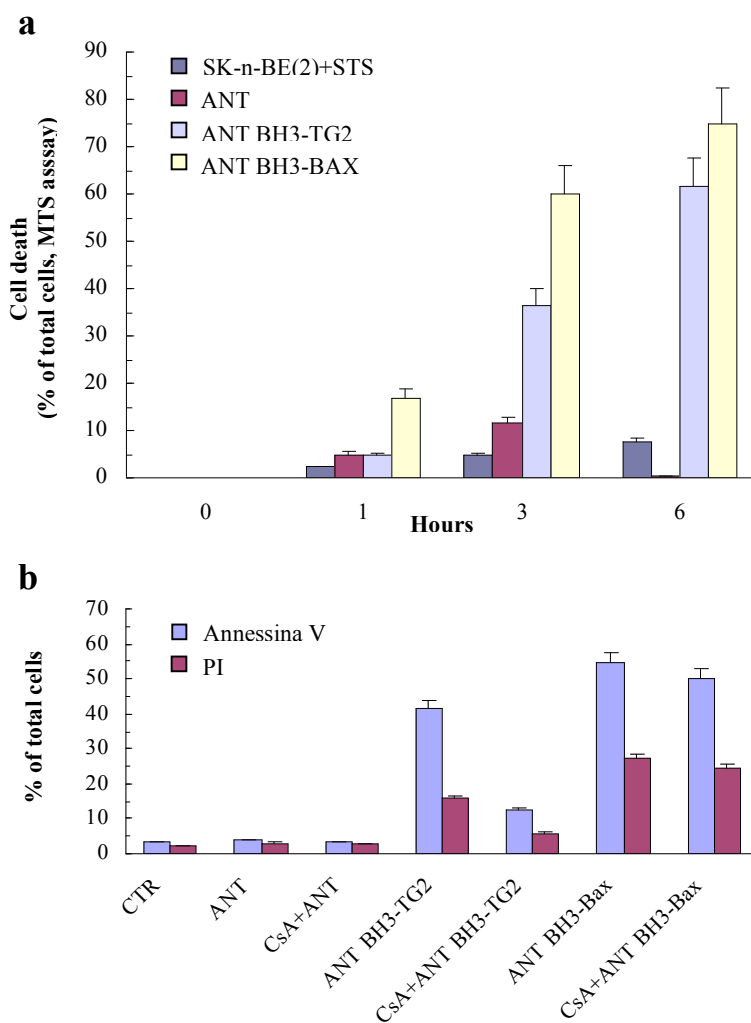
L'analisi della sequenza del dominio BH3 della TG2, lascia supporre un'interazione con le proteine della famiglia di Bcl-2. Se effettivamente il putativo dominio BH3 della TG2 interagisce con i membri pro-apoptotici della famiglia, quali Bax e/o Bak, deve anche essere in grado di modularne l'attività e quindi si dovrebbe osservare induzione di apoptosi, mediata dalla via mitocondriale.

Per verificare questa ipotesi abbiamo disegnato un peptide che ricalca la sequenza del dominio TG2-BH3 fusa con la sequenza naturale Antennapedia (Derossi et al., 1996; Derossi et al., 1994; Holinger et al., 1999), la quale permette al peptide di penetrare all'interno della membrana plasmatica delle cellule (ANT-BH3 TG2). Come controllo positivo abbiamo usato il peptide che ricalca il dominio BH3 di Bax (ANT-BH3 Bax) e come controllo negativo quello costituito dalla sola sequenza Antennapedia (ANT).

L'effetto biologico del trattamento delle cellule di neuroblastoma SK-N-BE(2) con i peptidi ANT-BH3 nel tempo è stato analizzato monitorando la vitalità biochimica della cellula, mediante un saggio MTS. La **Figura 2a** riporta i valori di morte cellulare quantificati attraverso l'incapacità delle cellule morte di metabolizzare un composto del tetrazolio (MTS). Il trattamento con i peptidi ANT-BH3 TG2 e ANT-BH3 Bax ad una concentrazione di 50  $\mu$ M, induce morte cellulare, il cui andamento è simile e raggiunge circa il 70% dopo 6 ore. Si noti inoltre come il peptide con la sola sequenza ANT non induca morte cellulare, quindi l'effetto riscontrato è a totale carico dei domini BH3. Un ulteriore controllo è stato effettuato trattando le cellule SK-N-BE(2) con staurosporina (STS), un induttore della via mitocondriale dell'apoptosi. Come già riportato nell'introduzione, il nostro gruppo ha in precedenza osservato che l'induzione di apoptosi, con STS in cellule che non esprimono TG2, avviene solo dopo circa 20 ore, mentre in quelle che iperesprimono l'enzima avviene dopo circa 6 ore (Piacentini et al., 2002), dunque questo ultimo andamento è piuttosto simile a quello osservato con i peptidi. Infatti come si può osservare in figura il trattamento con STS ai tempi indicati induce morte in una percentuale poco significativa.

La **Figura 2b** mostra, invece, un esperimento in cui le cellule SK-N-BE(2) sono state trattate con i diversi peptidi per 6 ore in presenza e non di Ciclosporina A (CsA), un noto inibitore della permeabilizzazione dei pori della membrana mitocondriale. L'analisi al citofluorimetro della frammentazione nucleare mediante ioduro di propidio e

dell'esternalizzazione della fosfatidilserina mediante annessina V, rivela che la CsA inibisce soltanto la morte delle cellule trattate con il peptide TG2-BH3.

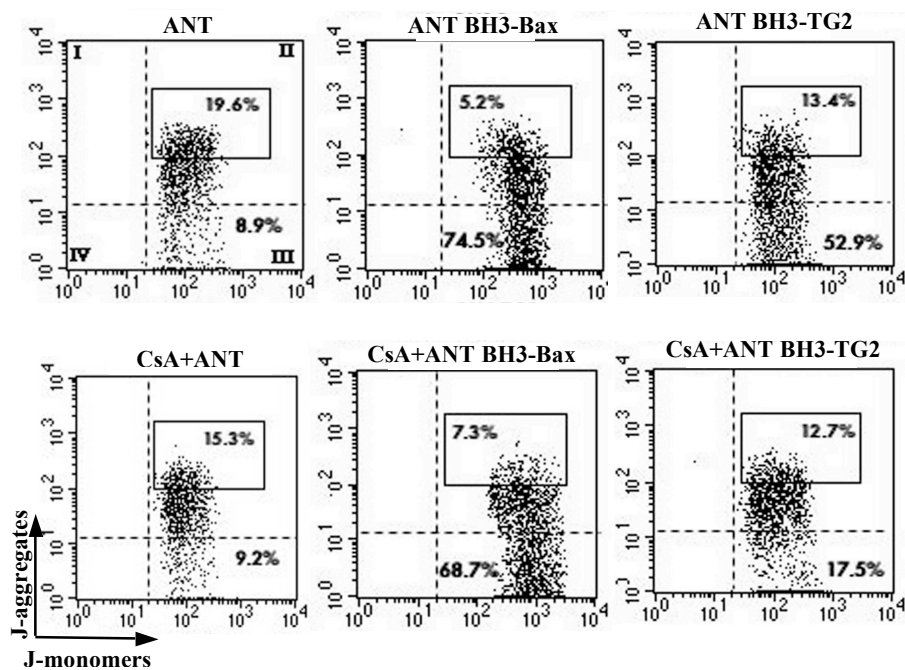


**Figura 2. (a)** Saggio della funzionalità cellulare MTS, delle cellule trattate con i peptidi (50µM). Il trattamento con STS (1µM) è stato usato come controllo. **(b)** Analisi al citofluorimetro delle cellule marcate con annessina V-FITC/PI trattate con i peptidi con e senza CsA (1mM).

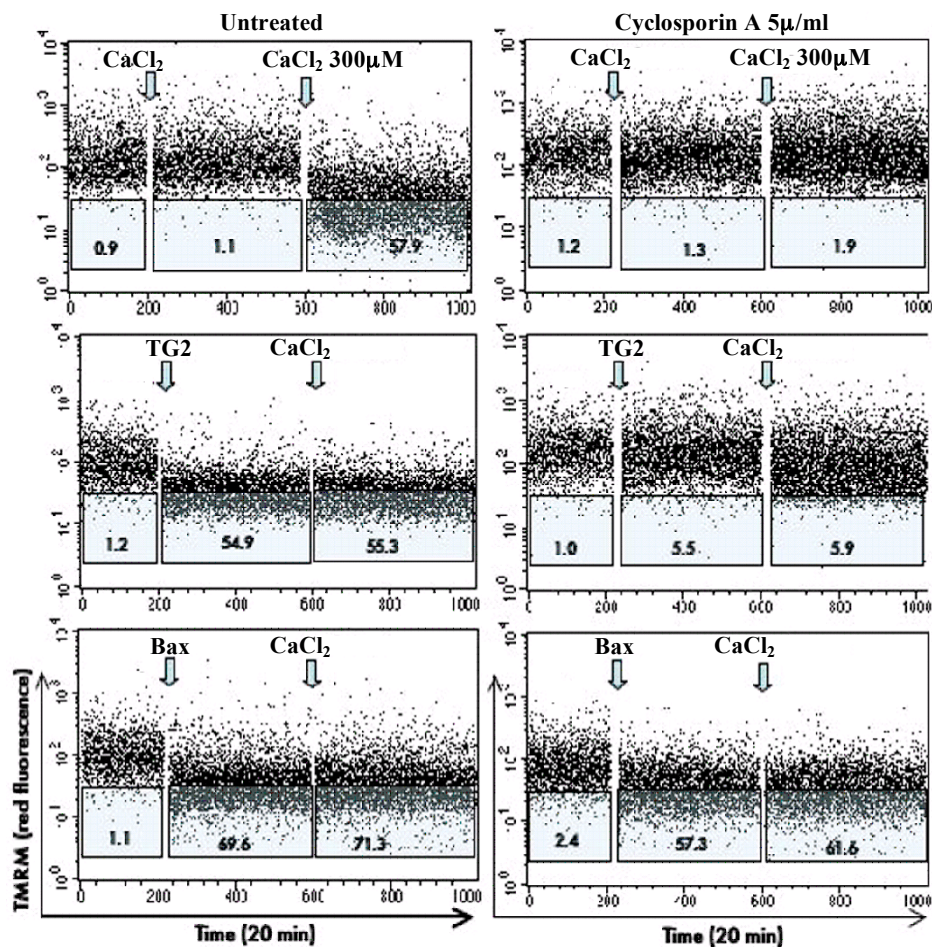
### **3. Il peptide TG2-BH3 induce la depolarizzazione mitocondriale**

Nel lavoro, già citato nel paragrafo precedente, pubblicato nel nostro laboratorio (Piacentini et al., 2002), è stato visto che la maggiore suscettibilità all'apoptosi delle cellule iperesprimenti TG2 (TGA), è in relazione allo stato di iperpolarizzazione dei mitocondri. Per verificare il possibile ruolo del dominio BH3 della TG2 sulla polarizzazione mitocondriale, abbiamo analizzato lo stato dei mitocondri delle cellule SK-N-BE(2) prima e dopo trattamento con i peptidi. Il potenziale transmembrana dei mitocondri è stato studiato utilizzando JC-1, un colorante metacromatico in grado di penetrare selettivamente nei mitocondri. JC-1 è in grado di emettere fluorescenza a due diverse lunghezze d'onda a seconda del potenziale transmembrana: verde nel caso di mitocondri depolarizzati (JC-1 si lega come monomero) e rosso-arancio nel caso di membrana mitocondriale polarizzata (JC-1 forma degli aggregati). L'analisi dei campioni al citofluorimetro ha mostrato che sia il peptide TG2-BH3 sia il peptide Bax-BH3, inducono la depolarizzazione mitocondriale (dopo 1h di trattamento) e che il pretrattamento con la CsA inibisce tale depolarizzazione soltanto nelle cellule trattate con il peptide TG2-BH3 (**Figura 3**). Ciò indicherebbe che tale peptide induce depolarizzazione mitocondriale mediante un meccanismo diverso da quello utilizzato dal peptide Bax-BH3.

Nella **Figura 4** l'analisi al citofluorimetro della variazione di fluorescenza (TMRM), mostra che i peptidi TG2-BH3 e Bax-BH3, sono in grado di indurre lo "swelling" dei mitocondri isolati e anche in questo caso, l'inibizione della CsA si osserva soltanto sui mitocondri trattati con il peptide TG2-BH3. Questo è in accordo con quanto visto nelle cellule. Il CaCl<sub>2</sub> è stato utilizzato come controllo positivo.



**Figura 3:** analisi al citofluorimetro della MMP, valutata mediante marcatura con JC-1, delle cellule SK-n-BE, trattate (1h) con i peptidi (50 $\mu$ M) con e senza CsA (1mM). I valori riportati nel rettangolo rappresentano la percentuale di cellule con mitocondri iperpolarizzati MMHP. I valori riportati sotto la linea tratteggiata rappresentano la percentuale di cellule con mitocondri depolarizzanti.

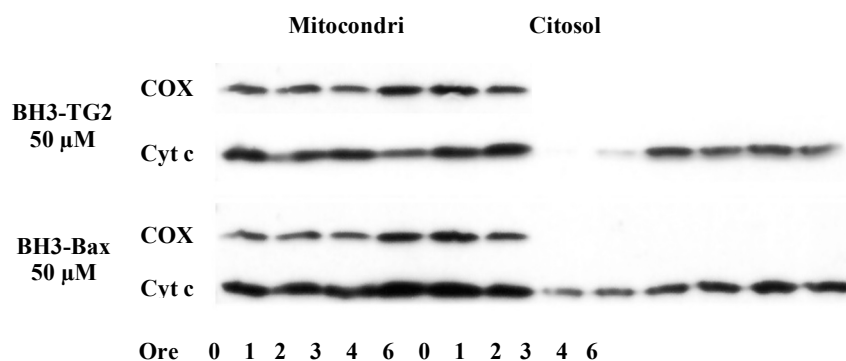


**Figura 4.** Analisi al citofluorimetro della MMP, valutata mediante variazione della fluorescenza (TMRM) in funzione del tempo, dei mitocondri isolati dalle cellule SK-n-BE, trattati con i peptidi (10μM) con e senza CsA. I numeri nelle aree indicano la percentuale di mitocondri che mostrano perdita del potenziale di membrana mitocondriale.

#### 4. Il peptide TG2-BH3 induce rilascio di citocromo c sia nelle cellule sia nei mitocondri isolati

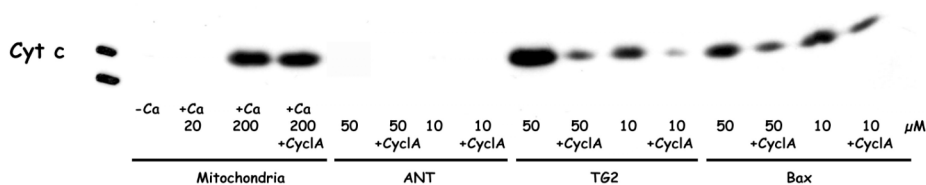
Per verificare se l'apoptosi indotta dal peptide TG2-BH3 coinvolga la via mitocondriale, abbiamo analizzato il rilascio di citocromo c sia *in vivo* che in mitocondri isolati. Le cellule SK-N-BE(2), cresciute in piastre da 6 pozzetti, sono state trattate con i peptidi TG2-BH3 e Bax-BH3 (50  $\mu$ M) per tempi diversi (da 0 a 6 ore). Successivamente, la frazione mitocondriale è stata separata da quella citosolica tramite centrifugazione differenziale. La presenza di citocromo c in entrambe le frazioni è stata analizzata per mezzo di un Western blot. Nella **Figura 5** si può notare che il peptide TG2-BH3, così come il controllo positivo Bax-BH3, induce un rilascio, crescente nel tempo di citocromo c, *in vivo*, confermando la capacità del dominio di interagire con le proteine coinvolte nel rilascio delle molecole contenute nello spazio intermembrana dei mitocondri.

Per controllare la purezza del preparato abbiamo analizzato, la presenza di citocromo c ossidasi in entrambe le frazioni ottenute. Come mostrato in figura, la citocromo c ossidasi, che è una proteina della membrana mitocondriale esterna, compare solo nella frazione mitocondriale poiché la separazione dei componenti cellulari è stata eseguita correttamente.



**Figura 5.** Analisi mediante WB del rilascio di cyt c nelle cellule SK-n-BE, trattate con i peptidi ai tempi indicati. La Citocromo c ossidasi (COX) è stata usata come controllo della bontà della separazione dei mitocondri.

Lo stesso tipo di risultato si è ottenuto anche utilizzando mitocondri isolati da cellule SK-N-BE(2). Questi sono stati trattati per 20 minuti con concentrazioni diverse di peptidi TG2-BH3 e Bax-BH3 (10 e 50  $\mu\text{M}$ ). Come controllo positivo e negativo, sono stati utilizzati rispettivamente il  $\text{CaCl}_2$  e il peptide ANT. Dopo tale trattamento i mitocondri sono stati recuperati tramite centrifugazione e lisati. La presenza di citocromo c, nella frazione mitocondriale e nel surnatante, è stata esaminata tramite Western blot. In **Figura 6** si vede che, anche in questo caso, dopo trattamento con i peptidi che mimano il dominio BH3, il citocromo c viene rilasciato dallo spazio intermembrana dei mitocondri e anche in questo caso, l'inibizione della CsA si osserva maggiormente sui mitocondri trattati con il peptide TG2-BH3. Questa è un'ulteriore conferma di un'azione a livello mitocondriale del dominio TG2-BH3. Tale effetto può essere dovuto ad un'azione diretta sull'organello, oppure all'interazione con le proteine della famiglia di Bcl-2. Il risultato netto di queste interazioni è comunque il rilascio di citocromo c.



**Figura 6.** Analisi mediante WB del rilascio di cyt c dai mitocondri isolati dalle cellule SK-n-BE, trattati con i peptidi (10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ) con e senza CsA (5  $\mu\text{M}$ ). Il trattamento con  $\text{CaCl}_2$  è stato usato come controllo positivo.

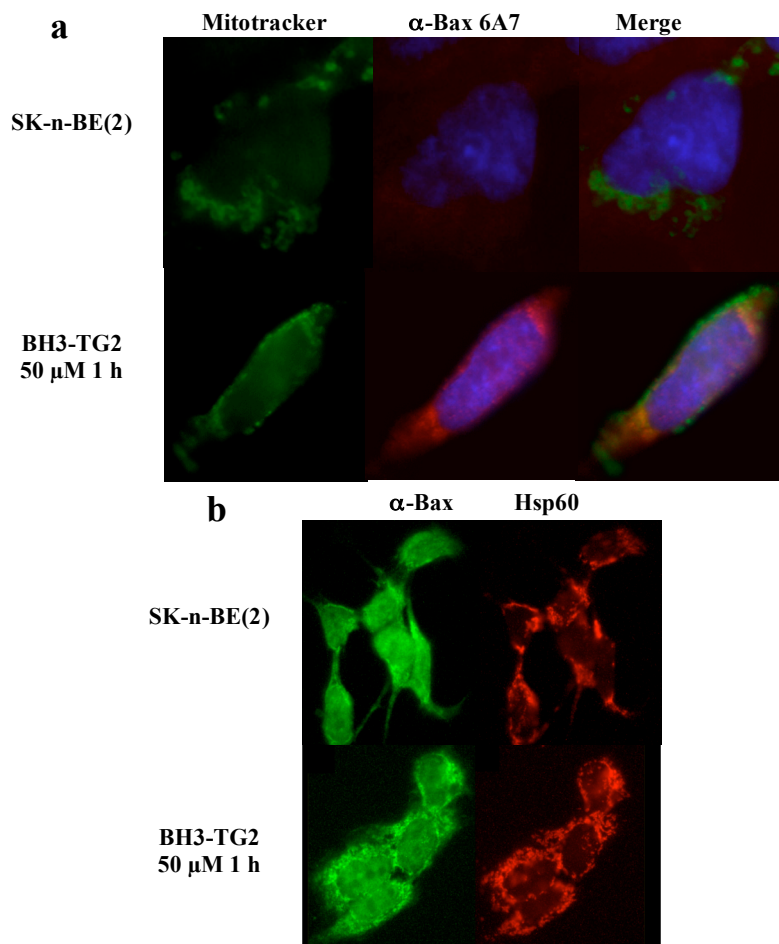
## 5. Il peptide TG2-BH3 induce traslocazione di Bax sui mitocondri e condensazione nucleare

L'interpretazione dei dati ottenuti fino ad ora, comunque, suggerisce che il ruolo svolto dalla TG2 a livello mitocondriale sia di regolazione delle proteine che consentono il rilascio di citocromo c, attraverso un'interazione mediata dal dominio BH3. Per chiarire questo punto abbiamo analizzato, nelle cellule SK-N-BE(2), possibili variazioni sia nella localizzazione subcellulare della proteina pro-apoptotica Bax, non potendo estendere l'analisi alla proteina Bak per mancanza di buoni anticorpi  $\alpha$ Bak, sia eventuali cambiamenti della morfologia cellulare mediante l'utilizzo dell'anticorpo anti-Bax 6A7. Questo ultimo anticorpo riconosce un epitopo all'estremità N-terminale di Bax solo quando la proteina è attiva, infatti, normalmente l'epitopo non è esposto al solvente ma quando la conformazione della proteina cambia, per spostamento dell'estremità N-terminale e dell' $\alpha$ -elica C-terminale, l'epitopo diviene accessibile e Bax si inserisce in membrana. Le immagini ottenute al microscopio a fluorescenza, mostrano che tale proteina in seguito al trattamento con il peptide TG2-BH3 va incontro a cambiamento conformazionale (**Figura 7a**). Nella **Figura 7b**, invece, la localizzazione subcellulare di Bax è stata rivelata con un anticorpo policlonale (anti-Bax N 20, Santa Cruz) che riconosce tutte le forme di Bax, come marker mitocondriale un anticorpo contro la proteina della matrice Hsp 60 ( $\alpha$ -Hsp 60, Stressgen). Quello che si osserva è una marcatura diffusa delle cellule, ed una morfologia cellulare classica delle cellule neuronali. Dopo il trattamento col peptide TG2-BH3, invece, la marcatura per Bax risulta puntiforme e la sovrapposizione con la marcatura per Hsp 60 ne evidenzia la localizzazione mitocondriale, inoltre le cellule appaiono più tondeggianti e presentano la tipica condensazione nucleare.

La traslocazione di Bax in seguito al trattamento coi peptidi potrebbe avvenire con le seguenti due modalità:

- 1) il peptide TG2-BH3, interagendo nel citosol con Bax monomero, ne indurrebbe il cambiamento conformazionale necessario per la traslocazione e l'inserzione nella membrana mitocondriale esterna;
- 2) il peptide TG2-BH3, competendo con Bcl-2, potrebbe alterare l'equilibrio degli eterodimeri mitocondriali Bcl-2/Bax. Bax sarebbe così in grado di attivare Bax monomero e di oligomerizzare e mediare il rilascio delle molecole contenute nello spazio intermembrana.

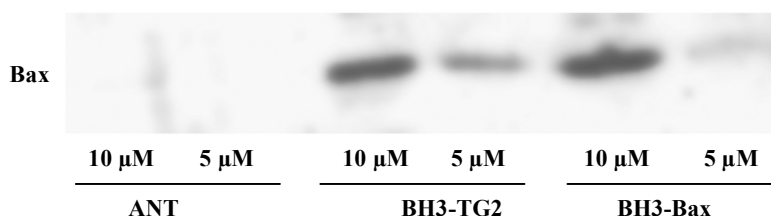
Queste due ipotesi non sono alternative, anche se la seconda sembra favorita dalla maggiore similitudine a livello aminoacidico che il dominio della TG2 mostra nei confronti del dominio BH3 di Bcl-2, rispetto a quello di Bax.



**Figura 7.** Analisi al microscopio a fluorescenza del cambiamento conformazionale e della traslocazione di Bax sui mitocondri, indotto dal trattamento delle cellule SK-n-BE con il peptide BH3-TG2. **(a)** L'anticorpo  $\alpha$ -Bax 6A7 (in rosso) riconosce soltanto Bax che ha cambiato conformazione, il mitotraker è usato come marker mitocondriale. **(b)** L'anticorpo  $\alpha$ -Bax N-20 (in verde) riconosce ogni forma di Bax, qui i mitocondri sono stati marcati con il marker mitocondriale Hsp60 (rosso).

## 6. Il peptide TG2-BH3 interagisce con Bax

La prova definitiva dell'interazione tra il putativo dominio BH3 della TG2 e Bax si è ottenuta utilizzando peptidi biotinilati all'estremità N-terminale. In questo modo è stato possibile isolare le proteine che coprecipitano col peptide (vedi "Materiali e metodi"). I mitocondri isolati dalle cellule SK-N-BE(2), sono stati trattati con i peptidi TG2-BH3, Bax-BH3 (controllo positivo) ed ANT (controllo negativo), tutti biotinilati all'estremità N-terminale e in concentrazione 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, per 30 minuti. I peptidi biotinilati sono stati recuperati per mezzo di sferette di streptavidina e le proteine coprecipitate sono state analizzate tramite 4-12% Nu PAGE e successivo Western blot. La **Figura 8** mostra come i peptidi TG2-BH3 e Bax-BH3, ma non ANT, interagiscano e coprecipitino Bax. Questo risultato suggerisce che il dominio BH3 della TG2 sia responsabile dell'interazione Bax-TG2.



**Figura 8.** Co-precipitazione di Bax, sui mitocondri isolati dalle cellule SK-n-BE, trattati con i peptidi biotinilati all'estremità N-terminale (10  $\mu$ M e 5  $\mu$ M).

## 7. La TG2 media la via mitocondriale dell'apoptosi interagendo con Bax

Sulla base degli esperimenti precedenti, effettuati con i peptidi che mimano il dominio BH3 della TG2, ipotizziamo che il nostro enzima non solo interagisca con Bax ma sia anche in grado di indurre quel cambiamento conformazionale, sui mitocondri e/o nel citoplasma, che permetterà alla proteina pro-apoptotica di oligomerizzare sui mitocondri per rilasciare citocromo c, AIF ed altre molecole, le quali avvieranno lo smantellamento dei componenti cellulari. Per verificare questa ipotesi abbiamo confrontato la capacità della TG2 di interagire con Bax in condizioni normali e dopo

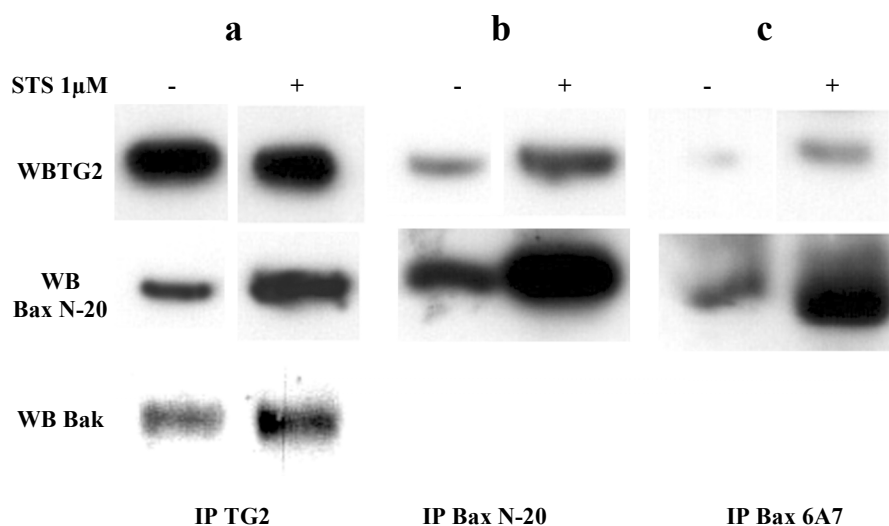
induzione di morte cellulare, utilizzando il clone TGA, ottenuto per trasfezione della linea SK-N-BE(2) con il cDNA della TG2 (vedi “Materiali e Metodi”). Queste cellule TGA, a differenza della linea parentale, iperesprimono l’enzima. Gli estratti cellulari totali sono stati preparati nel buffer lisi CHAPS, un detergente che non induce il cambiamento conformazionale di Bax, e successivamente sono stati immunoprecipitati con gli anticorpi anti-TG2 (monoclonale), anti-Bax N20 (policlonale) ed anti-Bax 6A7 (monoclonale). Gli immunoprecipitati (vedi “Materiali e metodi”) sono stati corsi su Nu-PAGE 4-12% ed analizzati tramite il Western blot riportato in **Figura 9**. Il primo pannello (**a**) in alto, mostra immunoprecipitati con l’anticorpo anti-TG2 rivelati con il medesimo anticorpo. La proteina è presente, come ci aspettavamo, solo nelle cellule TGA, sia prima che dopo induzione di apoptosi con STS. Nel pannello centrale (**a**) è evidente che gli immunoprecipitati con l’anticorpo anti-TG2 degli estratti cellulari delle TGA sono rivelati con l’anticorpo anti-Bax N20, quindi Bax è legato alla TG2, ma lo è in misura maggiore quando viene indotta apoptosi con STS.

Nel terzo pannello (**a**) in basso gli immunoprecipitati con l’anticorpo anti-TG2 sono rivelati con l’anticorpo anti-Bak, la positività del segnale indica che la TG2 immunoprecipita la proteina Bak anche in assenza di stimolo apoptotico e non aumenta in modo significativo dopo trattamento con STS.

Nel quarto pannello (**b**) in alto, precipitando Bax con l’anticorpo anti-Bax N20 e rivelandolo con l’anticorpo anti-TG2, ancora una volta si nota che le due proteine, nelle cellule TGA, sono legate già in assenza di induzione di morte ma molto di più quando viene indotta apoptosi. Nel quinto pannello (**b**) in basso sono riportati gli immunoprecipitati con l’anticorpo anti-Bax N20, rivelati con lo stesso anticorpo, le bande testimoniano l’efficienza della precipitazione di Bax.

Nel sesto pannello (**c**) in alto, gli immunoprecipitati con l’anticorpo anti-Bax 6A7 vengono rivelati negli estratti cellulari totali delle cellule TGA con l’anticorpo anti-TG2. Il settimo pannello (**c**) in basso, mostra gli immunoprecipitati con l’anticorpo anti-Bax 6A7, rivelati con il medesimo anticorpo. Il cambiamento conformazionale di Bax, generalmente richiesto per l’inserzione nella membrana mitocondriale esterna, è rilevabile in entrambi i tipi di estratti cellulari. Questo è evidente anche quando le cellule non sono indotte a morire con STS, infatti, un certo numero di cellule va normalmente incontro a morte fisiologica. Questi esperimenti di immunoprecipitazione confermano l’interazione tra TG2 e Bax, questa avviene anche in assenza di stimoli apoptotici ma è più frequente dopo

induzione di morte cellulare. La TG2, come ci aspettavamo, è in grado di legarsi anche a Bax attivato. Poiché, anche il peptide che mima il dominio BH3 della TG2 si lega a Bax ed induce il rilascio di citocromo c è lecito supporre che l'enzima sia un modulatore della via mitocondriale dell'apoptosi, tramite l'interazione del suo dominio BH3 con la tasca idrofobica di Bax, rimasta esposta dopo l'attivazione.

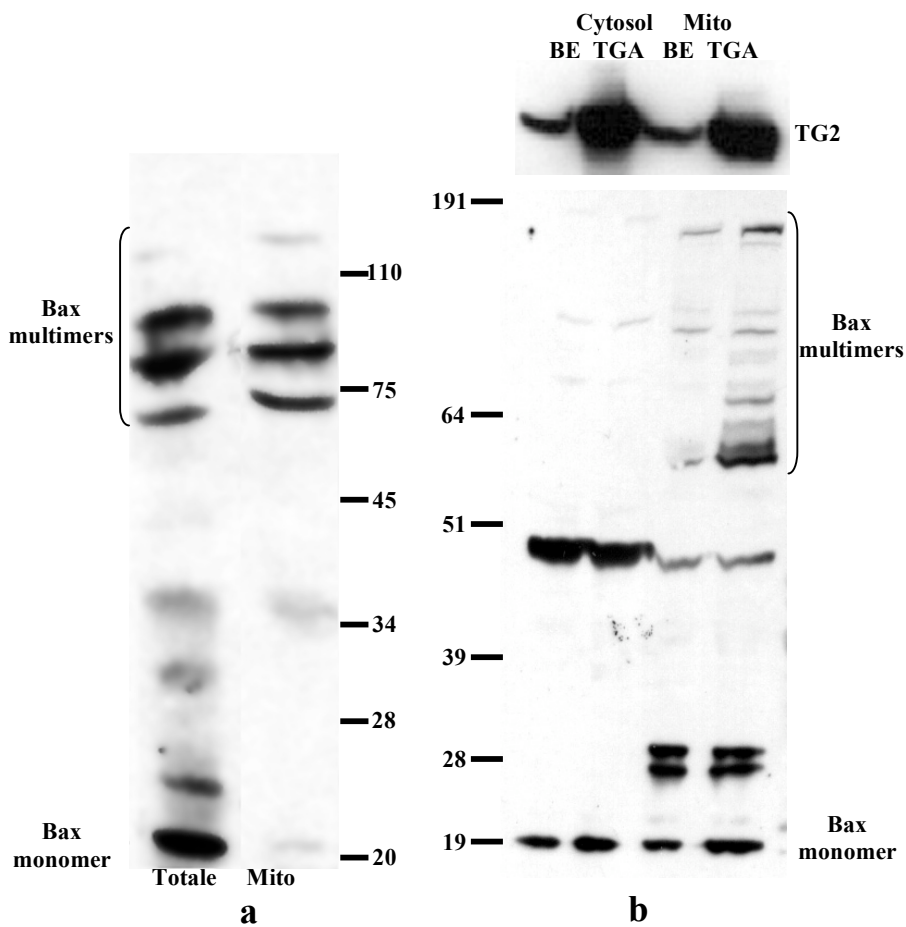


**Figura 9.** Identificazione, tramite immunoprecipitazione, dell'interazione tra TG2, Bax e Bak, nelle cellule TGA prima e dopo trattamento con STS (1 $\mu$ M). In **a** e **b**, le bande evidenziano chiaramente l'interazione tra la TG2 e Bax, anche prima dello stimolo apoptotico. L'interazione però, aumenta dopo stimolo apoptotico. Anche l'interazione TG2-Bak si osserva prima dello stimolo apoptotico (**a**). In **c** si osserva che la TG2 interagisce con la forma di Bax che ha cambiato conformazione. Questa interazione aumenta dopo trattamento con STS.

## **8. Sui mitocondri Bax agisce come substrato della TG2**

Come descritto nell'introduzione l'attività principale della TG2 è quella di catalizzare la formazione di legami crociati  $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lisina}$  tra proteine. Vista l'interazione tra la TG2 e Bax, sono andata a verificare se quest'ultima fosse un substrato dell'attività enzimatica della TG2. Le cellule TGA sono state precedentemente incubate con un substrato sintetico della TG2 5-(biotinamido)pentylamine (EZ-link) e successivamente trattate con STS ( $1\mu\text{M}$ ) per 2 ore. I mitocondri sono stati isolati e le proteine che avevano incorporato l'EZ-link biotilinato sono state purificate utilizzando delle sfere paramagnetiche legate alla streptavidina. Come si può osservare nella **Figura 10a**, la forma monometrica di Bax è presente soltanto nell'estratto totale, mentre le bande corrispondenti ad un peso molecolare compreso tra 50 e 200, sono presenti sia sull'estratto totale sia sui mitocondri. Queste bande ad alto peso molecolare, potrebbero essere dei multimeri di Bax, come già riportato da altri autori (Wei et al., 2000; Letai et al., 2002).

Per confermare questi risultati, sono andata ad analizzare, mediante Western blot, le proteine mitocondriali e citosoliche delle cellule SK-N-BE(2) e TGA, con l'anticorpo  $\alpha\text{-Bax}$  (N-20). Come si può osservare nella **Figura 10b**, in entrambe le frazioni citosoliche, Bax è presente principalmente come monomero, invece nei mitocondri l'anticorpo rivela bande corrispondenti ai multimeri di Bax. Inoltre, si può osservare come nei mitocondri delle cellule TGA, la banda corrispondente ad un peso molecolare di 60KDa sia maggiormente espressa.



**Figura 10. (a)** I mitocondri delle TGA trattate con STS (1 $\mu$ M), in presenza di EZ-link biotinilato, sono stati isolati e le proteine biotinilate sono state successivamente purificate. L'analisi mediante WB con l'anticorpo  $\alpha$ -Bax (N-20) rivela la presenza del monomero di Bax soltanto nell'estratto totale, mentre i multimeri sono presenti sia sul totale sia sui mitocondri isolati. **(b)** Le proteine mitocondriali e citosoliche estratte dalle cellule SK-n-BE e TGA sono state analizzate mediante WB con l'anticorpo  $\alpha$ -Bax (N-20).

## **RISULTATI (II PARTE)**



### 1. Analisi della risposta a diversi stimoli di morte di linfoblasti HD

Negli ultimi anni, numerose evidenze hanno indicato un coinvolgimento della TG2 nella patogenesi di alcune malattie neurodegenerative, quali la corea di Huntington. Come già descritto nell'introduzione alla base del processo degenerativo, che si osserva nella malattia di Huntington, sembrano esserci tanto un'acquisizione di funzione tossica da parte dell'htt mutata quanto una perdita di funzione protettiva da parte della proteina normale. Entrambi questi eventi, portano a numerose alterazioni cellulari, che coinvolgono anche i mitocondri. Tali alterazioni mitocondriali possono in alcuni casi portare a morte cellulare, che può manifestarsi sia come apoptosi, sia come autofagia.

Quindi, nella seconda parte della tesi, mi sono occupata dello studio della funzione mitocondriale e del meccanismo di morte cellulare in linfoblasti umani, ottenuti attraverso l'immortalizzazione con il virus Epstein Barr, da linfociti di pazienti Huntington (HD). I donatori sono sia eterozigoti che omozigoti e il numero di ripetizioni "CAG" a livello del gene IT15, che codifica per l'huntingtina, è variabile (**Tabella**).

<b>Linea cellulare (LINFOBLASTI)</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Numero ripetizioni CAG</b>
HD2304	Omozigote (UVS=controllo)	minore di 36
HD-HE48	Eterozigote (LR=low number repeats)	48
HD-HE100	Eterozigote (HR=high number repeats)	100
HD-HO42/50	Omozigote (HHD)	compreso tra 42 e 50

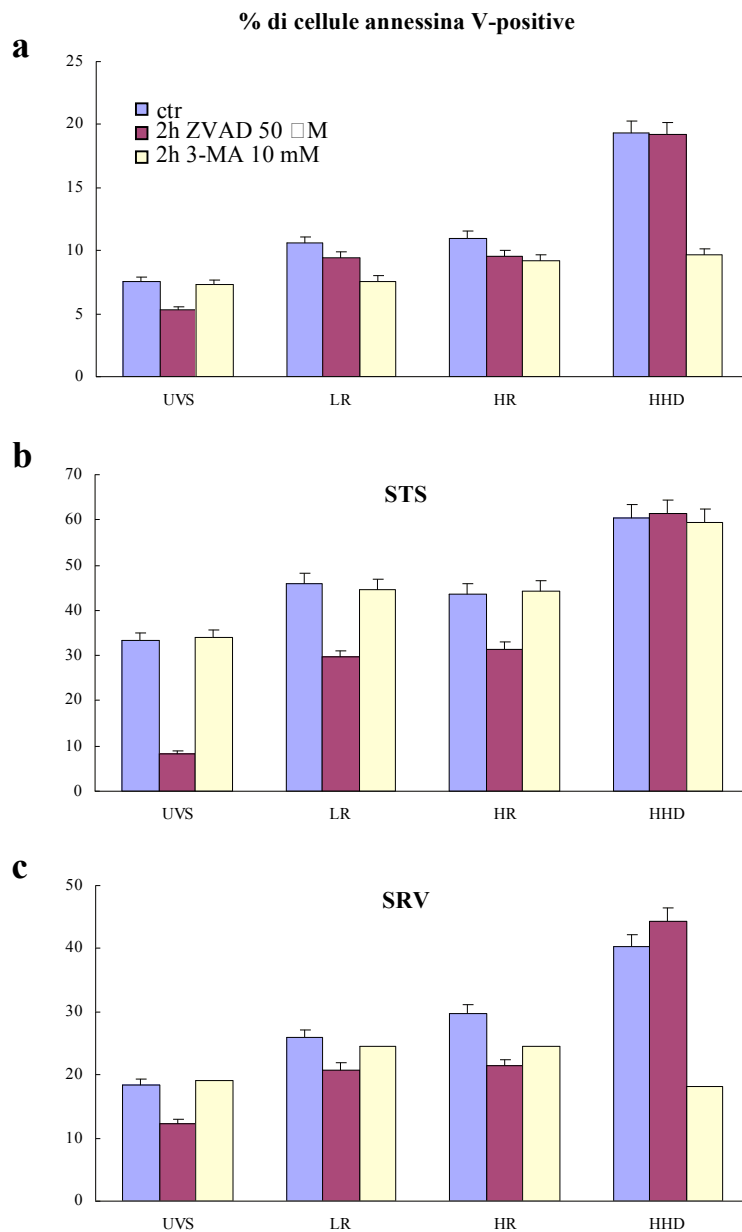
Per determinare il coinvolgimento dell'apoptosi e dell'autofagia nella corea di Huntington, è stata condotta un'analisi della risposta a diversi

stimoli di morte nei linfoblasti HD. L'analisi della morte cellulare è stata effettuata mediante citometria a flusso utilizzando l'annessina V.

I linfoblasti sono stati sottoposti ai seguenti stimoli di morte: trattamento con STS e privazione di siero, condizione, questa ultima, che conduce le cellule verso l'autofagocitosi. Le stesse analisi sono state effettuate anche in presenza dell'inibitore delle caspasi, zVAD e in presenza di 3-metil-adenina (3-MA), composto in grado di inibire in tempi precoci il processo autofagico (Seglen and Gordon, 1982).

Come si può chiaramente evincere dagli istogrammi (**Fig. 11a**), in condizioni normali di crescita, i linfoblasti ottenuti da donatori sani (UVS) mostrano dei bassi livelli di apoptosi spontanea, confrontabili con i valori di morte delle linee ottenute dai pazienti eterozigoti (LR e HR). Al contrario i linfoblasti dei pazienti omozigoti (HHD), mostrano una percentuale maggiore di positività all'annessina V, evidenziando significativi segni di apoptosi (circa, 20%; prima colonna HHD). Il trattamento con STS induce apoptosi sia nel controllo sia nelle linee HD sebbene in misura diversa (**Figura 11b**). Infatti, mentre nel controllo la percentuale di morte è del 30%, questa aumenta nelle linee eterozigoti e aumenta in modo più significativo negli omozigoti (prima colonna UVS, LR, HR, HHD). Anche dopo privazione di nutrienti (SRV), che è noto indurre apoptosi e autofagia (Codogno e Meijer 2005), si osserva una percentuale di morte più alta nelle cellule omozigoti rispetto alle eterozigoti (**Figura 11c**, prima colonna LR, HR, HHD).

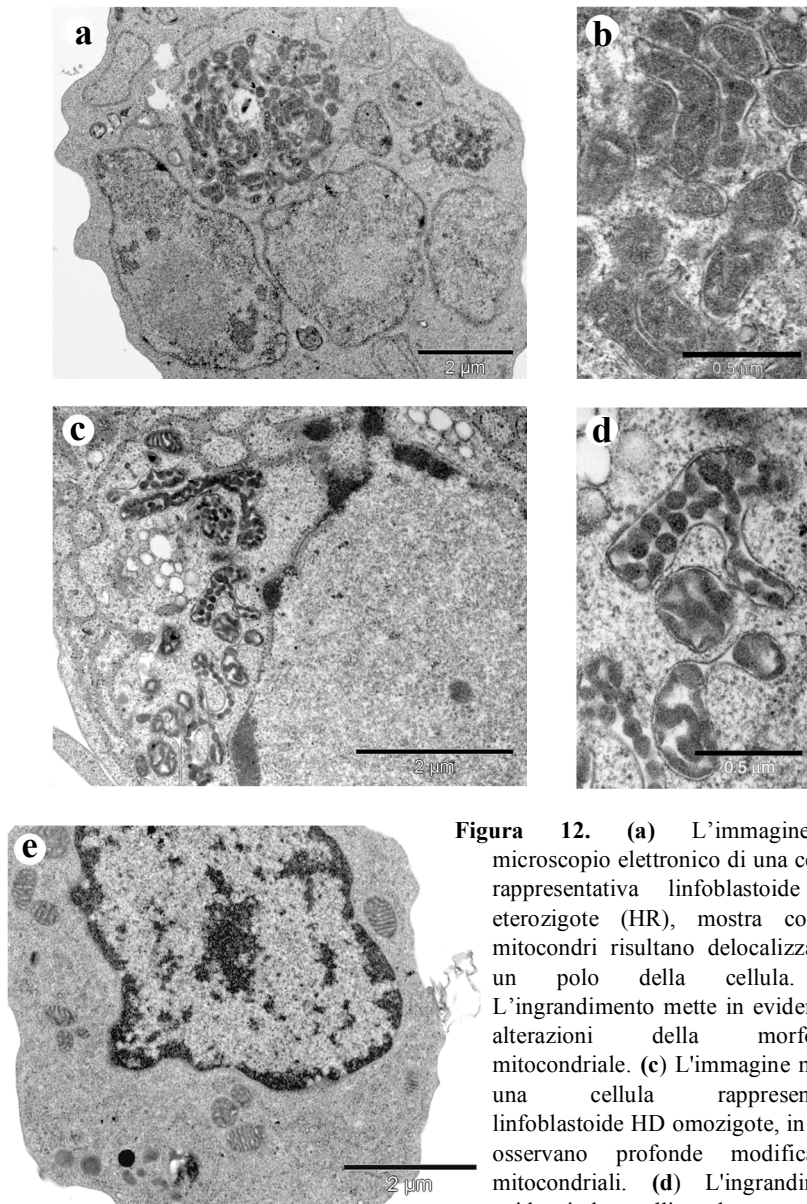
Dopo trattamento con zVAD, si osserva una riduzione della morte spontanea nel controllo UVS e nelle eterozigoti HD, mentre rimane invariata negli omozigoti HHD (**Fig. 11a**, seconda colonna UVS, LR, HR, HHD). Osservando la Fig. 11b con la 11c (seconda colonna), si vede che zVAD è in grado di inibire la morte soltanto nel controllo e negli eterozigoti. Infatti, negli omozigoti il trattamento con zVAD non ha alcun effetto e le cellule continuano a morire. Sulla base di questi risultati e di quelli presenti in letteratura (Iwata et al., 2005), i quali suggeriscono un ruolo dell'autofagia nel processo di morte nell'HD, abbiamo condotto l'analisi della morte anche in presenza del noto inibitore di autofagia 3-MA. Quello che si osserva è una riduzione dei livelli di morte spontanea nelle cellule HD (**Fig 11a**, terza colonna LR, HR, HHD). La cosa interessante è che il pretrattamento con la 3-MA è incapace di proteggere tutte le linee dall'apoptosi indotta da STS (**Fig. 11b**, terza colonna UVS, LR, HR, HHD), invece è in grado di proteggere dalla morte indotta da SRV, soprattutto nella linea omozigote (Fig. 11c, terza colonna UVS, LR, HR, HHD).



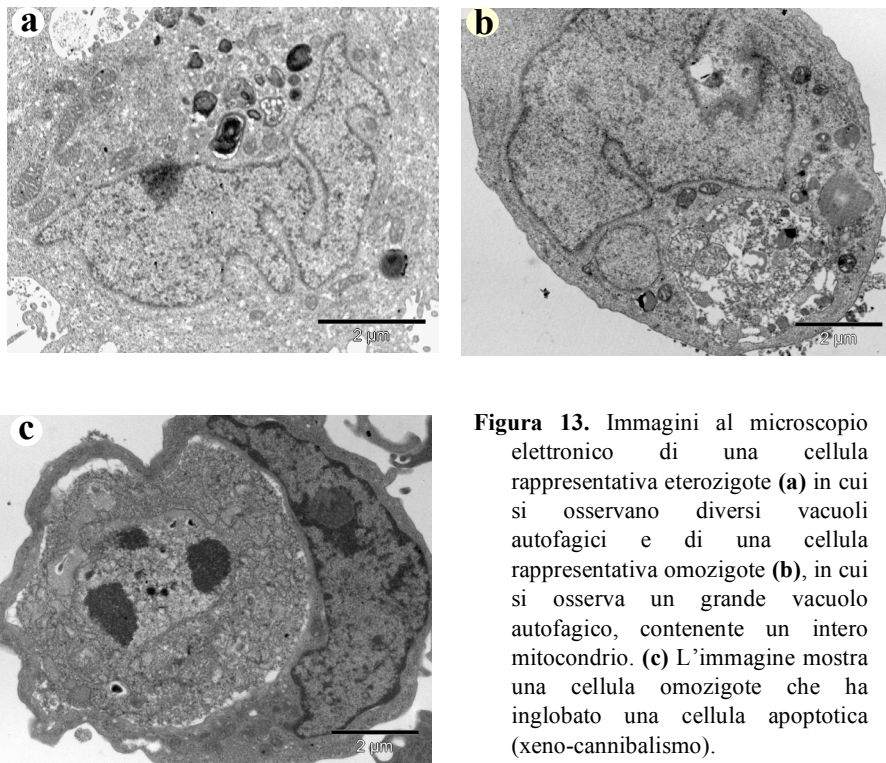
**Fig. 11.** Analisi dell'apoptosi mediante annessina-V dei linfoblasti, pretrattati con zVAD o 3-MA, non trattati (**a**), dopo trattamento con STS (**b**) e dopo deprivazione di nutrienti (SRV) (**d**).

## 2. Analisi ultrastrutturale della morte cellulare nei linfoblasti HD

L'analisi morfologica di queste linee cellulari al microscopio elettronico ha messo in evidenza rilevanti alterazioni a livello dei mitocondri. Sia negli eterozigoti che negli omozigoti, spesso, questi organelli si trovano localizzati ad un polo della cellula (**Figura 12a,c**). In particolare negli eterozigoti overesposti la membrana mitocondriale sembra perdere la sua integrità portando ad una sorta di fusione tra gli organelli (**Figure12b**). Negli omozigoti la struttura dei mitocondri sembra essere maggiormente alterata; in alcuni casi la caratteristica forma tubulare viene persa e la membrana interna sembra addossarsi alle creste mitocondriali, lasciando numerosi spazi tra le due membrane (**Figura12d**). Inoltre, in queste cellule sono presenti vacuoli autofagici, all'interno dei quali sono riconoscibili anche dei mitocondri. Il confronto tra linfoblasti HD eterozigoti e omozigoti mette in evidenza, per questi ultimi, una maggiore percentuale di cellule con evidenti segni di autofagocitosi (**Figura13**).



**Figura 12.** (a) L'immagine al microscopio elettronico di una cellula, rappresentativa linfoblastoide HD eterozigote (HR), mostra come i mitocondri risultano delocalizzati ad un polo della cellula. (b) L'ingrandimento mette in evidenza le alterazioni della morfologia mitocondriale. (c) L'immagine mostra una cellula rappresentativa linfoblastoide HD omozigote, in cui si osservano profonde modificazioni mitocondriali. (d) L'ingrandimento evidenzia lo swelling ultrastrutturale e mitoptosi. (e) Cellula rappresentativa linfoblastoide UVS con numerosi mitocondri nella loro classica forma.



**Figura 13.** Immagini al microscopio elettronico di una cellula rappresentativa eterozigote **(a)** in cui si osservano diversi vacuoli autofagici e di una cellula rappresentativa omozigote **(b)**, in cui si osserva un grande vacuolo autofagico, contenente un intero mitocondrio. **(c)** L'immagine mostra una cellula omozigote che ha inglobato una cellula apoptotica (xeno-cannibalismo).

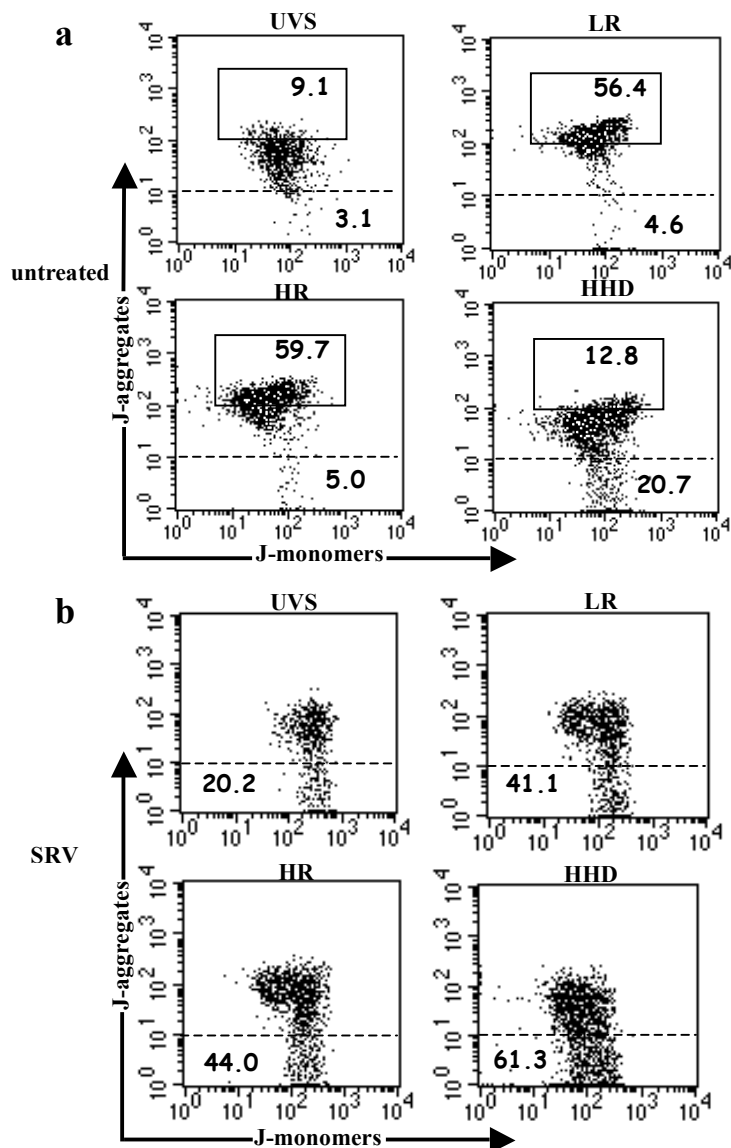
### **3. Analisi del potenziale della membrana mitocondriale**

Come già descritto nell'introduzione, esistono diversi stimoli in grado di indurre apoptosi e uno di questi vede coinvolti proprio i mitocondri. Studi recenti hanno mostrato che un evento precoce nella morte cellulare programmata è rappresentato dalla iperpolarizzazione della membrana mitocondriale (Gross et al., 2000; Kroemer and Reed, 2000).

Analisi su epatociti di ratto hanno evidenziato che, dopo induzione di autofagia, i mitocondri vanno incontro ad una depolarizzazione della loro membrana e in seguito si verifica il loro sequestro all'interno di autofagosomi; la depolarizzazione potrebbe rappresentare il segnale che determina l'autofagocitosi di questi organelli (Elmore et al., 2001).

In considerazione dell'anomala morfologia dei mitocondri HD e del legame tra morte cellulare e fenomeni di iperpolarizzazione e depolarizzazione, si è pensato di effettuare delle misure del potenziale della membrana mitocondriale ( $\Delta\psi_m$ ).

Il potenziale transmembrana dei mitocondri HD è stato valutato mediante citometria a flusso utilizzando il JC-1. I risultati indicano che solo una piccola percentuale delle cellule di controllo hanno mitocondri iperpolarizzati, mentre i linfoblasti eterozigoti (LR e HR) hanno una percentuale maggiore di mitocondri iperpolarizzati. Al contrario nei linfoblasti dei pazienti omozigoti HHD questa percentuale è bassa come quella dei controlli, mentre la percentuale di mitocondri depolarizzanti è circa il 20% (**Figura 14a**). L'analisi del potenziale di membrana mitocondriale, effettuata sulle cellule dopo l'affamamento, rivela che una significativa percentuale di cellule, ha mitocondri depolarizzanti (**Figura 14b**). Queste percentuali sono paragonabili a quelle osservate nell'analisi dell'apoptosi (**Figura 11**).

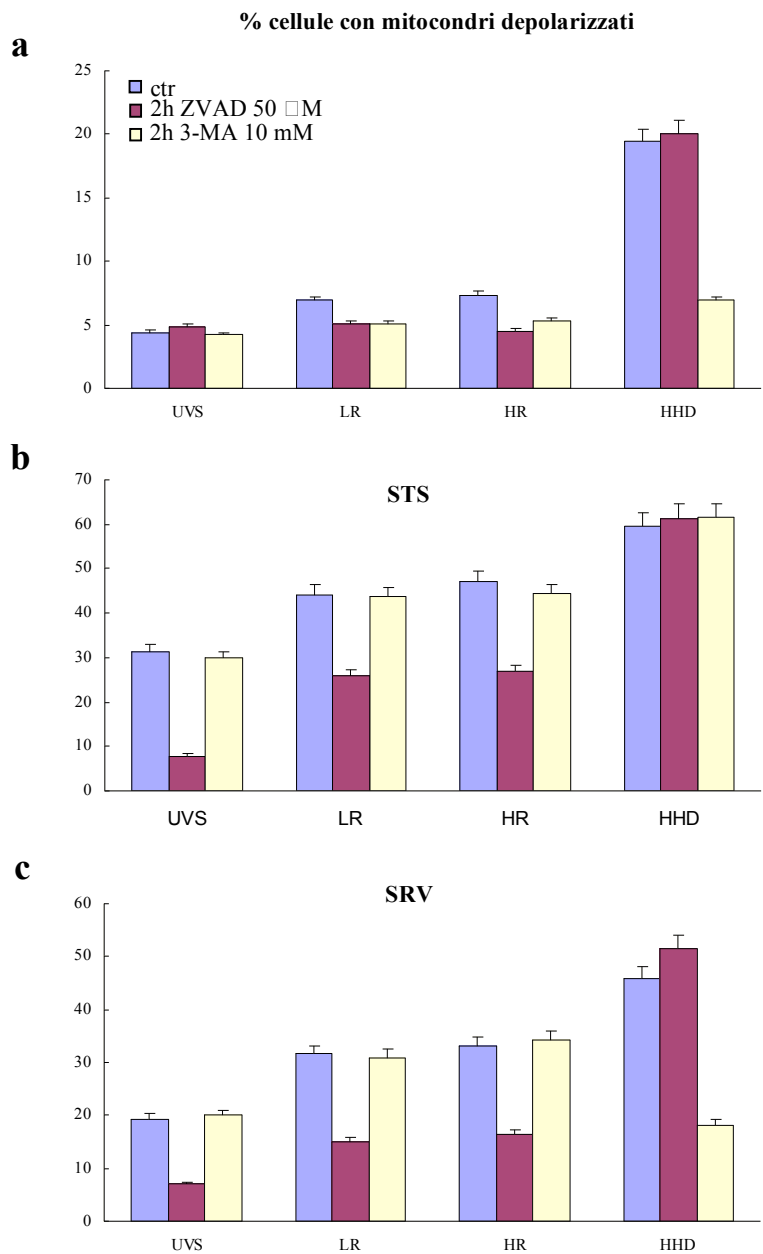


**Figura 14.** Analisi al citofluorimetro della MMP dei linfoblasti non trattati **(a)** e dopo privazione di nutrienti **(b)**. I valori riportati nel rettangolo, rappresentano la percentuale di cellule con mitocondri iperpolarizzati MMHP. I valori riportati sotto la linea tratteggiata, rappresentano la percentuale di cellule con mitocondri depolarizzanti.

Successivamente ho valutato l'analisi del potenziale di membrana mitocondriale dopo trattamento con l'inibitore delle caspasi, zVAD, e con l'inibitore dell'autofagia 3-MA, in condizioni normali (**Figura 15a**) in seguito all'induzione di morte cellulare con STS (**Figura 15b**) e alla deprivazione di nutrienti (**Figura 15c**). Quello che è emerso è che zVAD è in grado di proteggere le cellule di controllo ed eterozigoti (LR e HR) dalla depolarizzazione mitocondriale ma non le cellule omozigoti. Al contrario dopo deprivazione di nutrienti, la 3-MA è in grado di inibire la perdita di potenziale mitocondriale delle cellule omozigoti.

I linfoblasti HD eterozigoti sono caratterizzati da un incremento del potenziale della membrana mitocondriale rispetto ai controlli e tale iperpolarizzazione è in accordo con la maggiore sensibilità a stimoli apoptotici mostrata da queste cellule. Tali risultati confermano precedenti lavori, in cui l'iperpolarizzazione della membrana mitocondriale viene ipotizzata essere una condizione di maggiore sensibilità della cellula all'apoptosi.

La caratteristica rilevante dei linfoblasti HD omozigoti, rispetto al controllo e agli eterozigoti, è la presenza di mitocondri depolarizzati e tale depolarizzazione potrebbe rappresentare il segnale che porta all'eliminazione selettiva di questi organelli attraverso il processo di autofagocitosi.



**Fig. 15.** Analisi della MMP dei linfoblasti pretrattati con zVAD o 3-MA, non trattati (a), dopo trattamento con STS (b) e dopo deprivazione di nutrienti (SRV) (d).

#### **4. Analisi dell'autofagia nei linfoblasti HD mediante microscopia a fluorescenza**

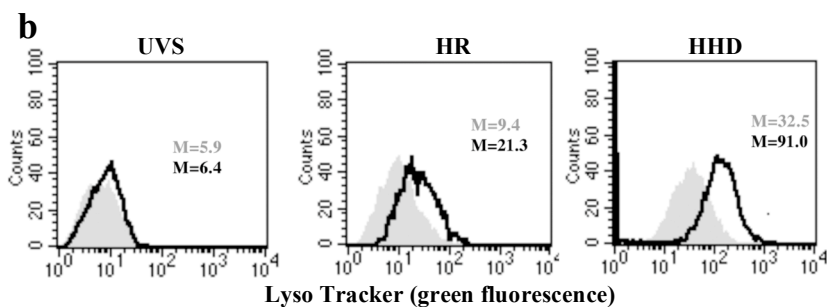
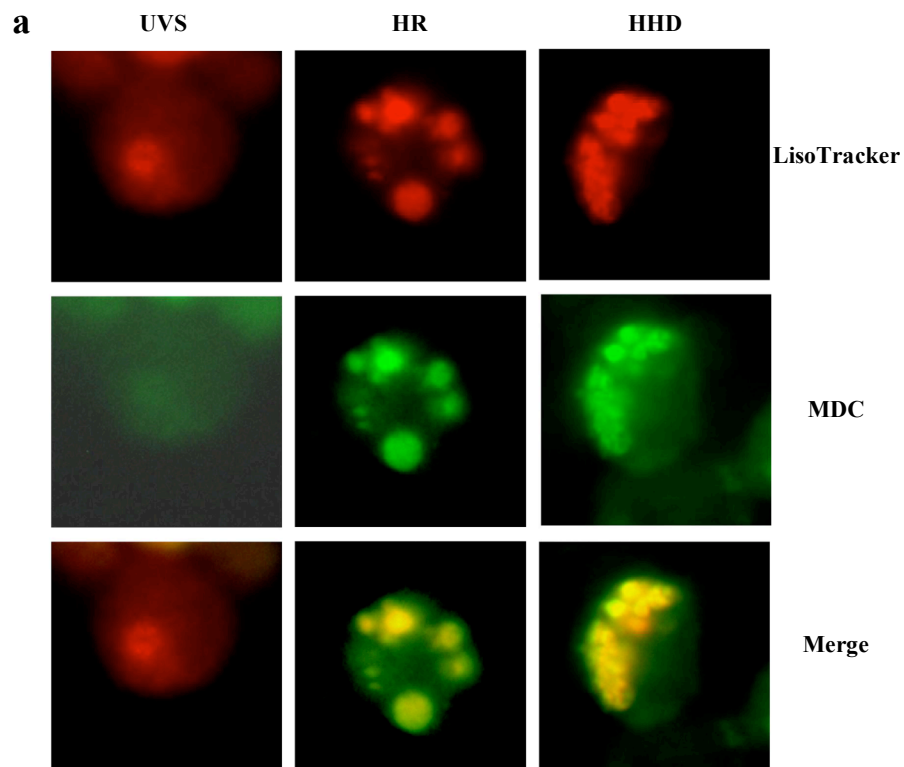
L'analisi dei linfoblasti HD omozigoti al microscopio elettronico ha messo in evidenza la presenza di tipici segni di autofagia; a confermare questa caratteristica c'è la maggiore sensibilità all'assenza di nutrienti mostrata da queste cellule e, probabilmente, anche la presenza di mitocondri depolarizzati.

Come descritto nell'introduzione, dopo la formazione di vacuoli autofagici, questi si fondono con i lisosomi e il loro contenuto viene degradato e in parte riciclato. L'utilizzo di marcatori specifici per strutture quali lisosomi e autofagosomi può aiutare a comprendere cosa accade nei linfoblasti HD nel caso dell'autofagia. Sono state eseguite delle osservazioni al microscopio a fluorescenza grazie all'utilizzo di sonde appropriate: come marcatore selettivo per i vacuoli autofagici è stata usata la monodansilcadaverina (MDC); per marcare selettivamente i lisosomi, strutture dal contenuto acido, è stato utilizzato il Lyso Tracker Red (LTR).

Tutte le linee cellulari sono state trattate con queste molecole fluorescenti, sia in condizioni normali che dopo privazione di nutrienti.

La MDC ha messo in evidenza la presenza di vacuoli autofagici nei linfoblasti HD omozigoti; infatti, in queste cellule, la fluorescenza non risulta diffusa come nel controllo e negli eterozigoti, ma va a delimitare delle regioni citoplasmatiche, che rappresentano degli autofagosomi (**Fig. 15a**).

Se si trattano le cellule con LTR, che va a marcare i lisosomi, vediamo che, mentre nel controllo e negli eterozigoti la fluorescenza è ristretta ad aree corrispondenti ai lisosomi, negli omozigoti queste aree hanno dimensioni maggiori e questo potrebbe essere compatibile con la presenza di compartimenti dal contenuto acido, che sono il risultato della fusione tra vacuoli autofagici e lisosomi (**Fig. 15a**). Inoltre anche l'analisi quantitativa al citofluorimetro, rivela un aumento della positività all'LTR sia negli eterozigoti sia negli omozigoti, in condizioni normali di crescita e in modo più marcato dopo privazione di nutrienti (**Fig. 15b**).



**Figura 15. (a)** Analisi al microscopio a fluorescenza, dei compartimenti lisosomiali, mediante Lyso Tracker Red (LTR) e dei vacuoli autofagici, mediante Monodansilcadaverina (MDC). **(b)** Analisi quantitativa al citofluorimetro dei compartimenti lisosomiali delle cellule in terreno completo (linea nera) e dopo privazione di nutrienti (in grigio). I numeri rappresentano i valori della mediana dell'istogramma.

## **DISCUSSIONE**



Nel processo di morte cellulare per apoptosi mediata dai mitocondri, il rilascio nel citosol dei fattori richiesti per l'induzione della morte, è associato con l'alterazione delle funzioni dei mitocondri, inclusa la perdita del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) (Kroemer and Reed, 2000). MMP si osserva anche durante la morte per autofagia; nell'autofagia, infatti, la depolarizzazione della membrana mitocondriale è seguita dalla cattura di questi organelli negli autofagosomi (Elmore et al., 2001). Pertanto, la perdita del MMP può rappresentare o un evento precoce nell'apoptosi o un segnale associato all'autofagocitosi dei mitocondri (Rodriguez-Enriquez et al., 2004).

Nel nostro gruppo è stato osservato che cellule di neuroblastoma iperesprimenti la proteina TG2 (TGA), presentano evidenti alterazioni mitocondriali (Piacentini et al., 2002) tra cui iperpolarizzazione della membrana. Inoltre, è stato visto che questa iperpolarizzazione, sensibilizza le cellule neuronali all'apoptosi e questa sensibilizzazione è indipendente dalla normale depolarizzazione dei mitocondri dovuta all'apertura dei pori PTP (Permeability Transition Pore). Questa osservazione ha suggerito un coinvolgimento della TG2 nella regolazione della via mitocondriale. Infatti, le cellule che iperesprimono TG2 mostrano mitocondri iperpolarizzati ma non un aumento dei livelli di apoptosi spontanea, mentre dopo trattamento con l'induttore di apoptosi staurosporina (STS), i mitocondri si depolarizzano molto velocemente e le cellule completano il processo apoptotico molto più rapidamente della linea cellulare che non esprime TG2 (SK-N-BE(2)). Questa osservazione è in accordo con altri lavori, che mostrano come un aumento del potenziale della membrana mitocondriale rappresenti una condizione di maggiore suscettibilità all'apoptosi (Gross et al., 2000; Kroemer and Reed, 2000).

L'identificazione di un putativo dominio BH3 nella TG2 e la sua capacità di sensibilizzare le cellule alla via mitocondriale dell'apoptosi, suggeriscono che il ruolo funzionale del dominio BH3-TG2 corrisponda a quello di alcuni membri pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2, coinvolti nella via mitocondriale dell'apoptosi. Le proteine responsabili di tale evento sono, Bax e Bak, le quali sono in grado di formare pori nella membrana mitocondriale esterna e la cui attivazione è regolata dagli altri membri della famiglia. In seguito al rilascio nel citosol, il citocromo c innesca la formazione dell'apoptosoma, il complesso che attiva la caspasi-9 ed innesca la cascata di eventi che condurranno a morte la cellula.

Per caratterizzare l'attività biologica del putativo dominio BH3 della TG2 (TG2-BH3), abbiamo disegnato un peptide che ricalca la sequenza

aminoacidica del dominio in questione, fusa con la sequenza naturale Antennapedia, che ne permette l'internalizzazione nelle cellule. Il trattamento della linea SK-N-BE(2), con il peptide BH3-TG2 ha evidenziato come questo sia in grado di indurre morte cellulare. L'andamento della morte cellulare, inoltre, è stato simile a quello già in precedenza osservato nelle cellule TGA, trattate con staurosporina.

Il trattamento col peptide TG2-BH3 induce, sia *in vivo*, sia sui mitocondri isolati, rilascio di citocromo c, "swelling" e depolarizzazione mitocondriale, in modo analogo al peptide Bax-BH3. L'unica interessante differenza tra i due peptidi, si osserva quando le cellule vengono trattate con la Cyclosporina A, l'inibitore della permeabilizzazione dei pori di membrana, infatti questa molecola ha effetto soltanto sulle cellule trattate con il peptide TG2-BH3. Questi dati confermano che il dominio TG2-BH3 agisce sui mitocondri, probabilmente interagendo con le proteine Bax e/o Bak, addette al rilascio di citocromo c dallo spazio intermembrana di questi organelli cellulari. Per verificare che queste interazioni proteina-proteina ci fossero, abbiamo analizzato le possibili variazioni nella localizzazione subcellulare delle molecole coinvolte nel rilascio di citocromo c. Abbiamo effettuato l'analisi solamente per Bax. Bax in forma monometrica è presente per lo più nel citosol e solo in bassa percentuale è rinvenibile sulle membrane intracellulari. Dopo trattamento col peptide TG2-BH3, si è notato che Bax trasloca sui mitocondri, dove probabilmente media il rilascio delle molecole contenute nello spazio intermembrana. Contemporaneamente, infatti, si è osservato anche un cambiamento morfologico delle cellule trattate col peptide TG2-BH3, queste, molto più tondeggianti, hanno mostrato la tipica condensazione nucleare delle cellule apoptotiche.

Per verificare se gli effetti che il peptide TG2-BH3 ha su Bax, dipendano veramente dall'interazione proteina-proteina, abbiamo isolato le proteine che interagiscono col peptide biotinilato all'estremità N-terminale. Tra le proteine che hanno coprecipitato con il dominio TG2-BH3, vi è, come ci aspettavamo, Bax. Contemporaneamente, per mezzo di esperimenti di immunoprecipitazione abbiamo confermato che anche l'enzima, e non solo il peptide analogo al suo dominio BH3, è in grado di interagire con Bax e Bak anche in assenza di stimolo apoptotico, nelle cellule TGA. Da questo quadro emerge che la TG2 è coinvolta durante l'apoptosi non solo in uno stadio tardivo, quando catalizza la formazione di legami covalenti tra proteine, durante la formazione dei corpi apoptotici, ma anche in stadi precoci, quando, agendo a livello mitocondriale, andrebbe a sensibilizzare le cellule e/o ad amplificare il segnale di morte, tramite il suo dominio BH3.

Inoltre i nostri esperimenti evidenziano che nelle cellule iperesprimenti la TG2, Bax citosolico sia presente in forma monomeric, mentre sui mitocondri esso appare aggregato, come già osservato da altri studi (Nechushtan et al., 2001).

I risultati presentati nella prima parte di questa tesi, suggeriscono che la TG2 possa essere un nuovo tipo di proteina "BH3-only" e le modalità di interazione e/o attivazione di Bax, la collocano esattamente tra le così dette "Bid-like proteins". Queste molecole, tramite il loro dominio BH3, sono capaci di attivare in modo diretto Bax e sono potenzialmente in grado di regolare anche altri membri della famiglia di Bcl-2.

Poiché negli ultimi anni, numerose evidenze hanno indicato un coinvolgimento della TG2 nella patogenesi di alcune malattie neurodegenerative, quali la corea di Huntington e dal momento che marcate alterazioni mitocondriali si osservano anche nelle cellule di pazienti affetti da questa malattia, nella seconda parte della tesi mi sono occupata dello studio del possibile ruolo di queste alterazioni nel processo di morte cellulare (PCD) nell'HD.

La mutazione da espansione di triplette "CAG" a livello del gene IT15, responsabile della corea di Huntington, dà origine a un tratto di poliglutammine (poli-Q) nella regione N-terminale dell'huntingtina (htt), proteina ubiquitariamente presente in tutti i tessuti umani. La neurodegenerazione che caratterizza questa patologia sembra essere dovuta tanto ad un'acquisizione di funzione tossica da parte dell'htt mutata, quanto ad un'assenza di funzione protettiva da parte della proteina wild-type (Cattaneo et al., 2001).

Diversi studi hanno messo in evidenza come disfunzioni mitocondriali, dovute alla presenza di htt mutata, potrebbero essere alla base di questa patologia (Schapira, 1997); come già descritto nella prima parte di questo paragrafo, l'induzione del processo di morte cellulare programmata può avvenire attraverso una via che coinvolge il mitocondrio. Pertanto, nel caso dell'HD, l'attivazione del processo apoptotico attraverso questa via potrebbe rappresentare il meccanismo alla base della morte neuronale.

In diverse malattie neurodegenerative, inoltre, è stato osservato il coinvolgimento di un meccanismo di morte attiva diverso dall'apoptosi, noto come autofagia (Di Figlia et al., 1995; Sapp et al., 1997).

Come modello di studio abbiamo utilizzato linfociti ottenuti da pazienti HD e immortalizzati con il virus Epstein-Barr; infatti, l'huntingtina, proteina ubiquitaria, viene espressa anche in queste cellule. Dopo trattamento con STS e privazione di nutrienti (SRV), condizione in grado di indurre

autofagia, è stato verificato che i linfoblasti HD risultano maggiormente suscettibili a questo tipo di stimoli di morte rispetto al controllo. I linfoblasti HD omozigoti (HHD), inoltre, sono la linea cellulare più sensibile all'autofagia, infatti, l'inibizione di questo processo con 3-MA, si traduce in una maggiore sopravvivenza delle cellule HHD.

L'analisi morfologica al microscopio elettronico ha messo in evidenza considerevoli alterazioni mitocondriali negli eterozigoti overespansi, cioè con un numero di ripetizioni CAG superiore a 100 (HR) e negli HHD. In queste linee cellulari i mitocondri, spesso, sono localizzati ad un polo della cellula, la loro caratteristica forma tubulare non sempre è riconoscibile e sia la membrana esterna che quella interna, sembrano perdere la loro integrità. Inoltre nei linfoblasti HHD, si osservano numerosi vacuoli autofagici, ciò indica la maggiore sensibilità di questa linea cellulare al processo di autofagocitosi.

I linfoblasti HD eterozigoti caratterizzati da un numero di triplette CAG pari a 48 (LR), presentano, rispetto agli eterozigoti overespansi, un minor numero di modificazioni a livello mitocondriale; questo dato conferma, come descritto nell'introduzione, che la lunghezza del tratto poli-Q influisce, oltre che sull'età di comparsa dei primi sintomi, anche sulla gravità del quadro clinico (Illarioshkin et al., 1994).

L'osservazione di uno stato di iperpolarizzazione della membrana mitocondriale nelle cellule eterozigoti conferma la loro maggiore suscettibilità a stimoli di morte, come il trattamento con STS. Nel caso dei linfoblasti HD omozigoti, al contrario, si osserva come una percentuale significativa di queste cellule sia caratterizzata da mitocondri depolarizzati, ossia organelli la cui funzionalità è compromessa. Le notevoli alterazioni della morfologia e della funzionalità dei mitocondri delineano, negli omozigoti, una condizione di maggiore gravità che, probabilmente, conduce queste cellule verso l'autofagia. Alcuni studi, infatti, hanno messo in evidenza come la depolarizzazione della membrana mitocondriale possa essere un segnale per l'autofagocitosi di questi organelli.

La monodansilcadaverina (MDC), marcatore fluorescente che riconosce in modo specifico i vacuoli autofagici, conferma la presenza di tali strutture nei linfoblasti HD omozigoti. In seguito a privazione di nutrienti, infatti, i vacuoli autofagici sono presenti in tutte le linee cellulari, ma le cellule omozigoti risultano essere le più sensibili a tale stimolo di morte.

Il Liso Tracker Red (LTR) è una molecola fluorescente utilizzata per visualizzare compartimenti dal contenuto acido come i lisosomi; la sua utilità nell'analisi dell'autofagia è dovuta al fatto che, come descritto

nell'introduzione, dopo la formazione dei vacuoli autofagici, questi si fondono con i lisosomi e il loro contenuto viene degradato. I risultati ottenuti con il LTR confermano quanto osservato con la MDC.

Riassumendo, i linfoblasti HD eterozigoti sono caratterizzati da un incremento del potenziale della membrana mitocondriale che è correlato a una maggiore suscettibilità all'apoptosi. Per quanto riguarda i linfoblasti HD omozigoti si osserva: maggiore suscettibilità a stimoli apoptotici sia rispetto al controllo che agli eterozigoti; presenza di mitocondri depolarizzati in un numero significativo di cellule e, caratteristica molto importante, evidenti segni di autofagia.

Come dimostrato da molti autori, tanto l'apoptosi quanto l'autofagia sembrano essere coinvolte nella patogenesi della corea di Huntington, ma resta da chiarire se, e in che modo, questi meccanismi possano essere correlati.

Si ritiene che l'htt mutata, come descritto nell'introduzione, possa essere la causa di diverse disfunzioni mitocondriali. Secondo un'ipotesi la proteina mutata potrebbe alterare la catena respiratoria mitocondriale, con conseguente depolarizzazione della membrana e in seguito a tale evento si verificherebbe un'apertura dei PTP, attraverso i quali possono fluire diversi ioni tra cui quelli  $Ca^{2+}$  (Panov et al., 2002). L'alterazione dell'omeostasi del  $Ca^{2+}$ , può mediare diversi eventi come l'attivazione di caspasi e calpaine. Questi enzimi sono in grado di proteolizzare l'htt mutata, portando alla liberazione del frammento N-terminale contenente il tratto poli-Q; tale frammento è in grado di interferire con numerose funzioni cellulari, che infine potrebbero portare a morte cellulare. Inoltre il rilascio di citocromo c dalla membrana mitocondriale, in seguito alla sua depolarizzazione, può contribuire a indurre apoptosi.

L'autofagia è coinvolta nell'HD in quanto processo implicato nella degradazione ed eliminazione dell'htt mutata (Ravikumar et al., 2002), attività svolta anche attraverso l'attivazione di enzimi come le caspasi. Questo meccanismo potrebbe essere indotto quando la proteina mutata si accumula a livelli elevati (Qin et al., 2003) e in risposta alla presenza di mitocondri depolarizzati.

La funzione del processo autofagico, almeno nelle fasi iniziali, è quella di contribuire all'eliminazione della proteina mutata e di organelli danneggiati al fine di evitare la morte cellulare. D'altra parte un'eccessiva induzione di autofagia, che comporta una massiva attivazione di enzimi proteolitici e l'eliminazione di interi organelli, associata alla compromissione dell'attività

del proteasoma, potrebbe risultare nociva portando, infine, al collasso della cellula (Qin et al., 2004).

Ciò che comunque risulta chiaro sia alla luce dei risultati ottenuti, sia sulla base delle informazioni presenti in letteratura, è il ruolo significativo che hanno le alterazioni morfologico-funzionali dei mitocondri nel processo patogenetico che determina l'insorgenza della malattia di Huntington. Non si può inoltre escludere che, sul lungo periodo queste possano diventare uno specifico target di importanza terapeutica.

## **BIBLIOGRAFIA**



Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X and Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002, **9**: 423-432.

Aeschlimann D and Paulsson M. Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb Haemos*. 1994, **71**: 402-415.

Apte SS, Mattei MG and Olsen BR. Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* 1995, **26**: 592-594.

Bailey CD and Johnson GV. Tissue transglutaminase contributes to disease progression in the R6/2 Huntington's disease mouse model via aggregate-independent mechanisms. *J Neurochem* 2005, **92**:83-92.

Barbeau A. Parental ascent in the juvenile form of Huntington's chorea. *Lancet* 1970, **2**: 937.

Beaulaton J and Lockshin RA. The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and an attempt at classification. *Int Rev Cytol* 1982, **79**, 215-235.

Campbell AM, Corner B, Norman RM and Urich H. The rigid form of Huntington's disease. *J Neuro. Neurosurg Psychiat*1961, **24**: 71-77.

Carrera AC. TOR signaling in mammals. *J Cell Sci* 2004, **117**: 4615-4616.

Cartron PF, Oliver L, Martin S, Moreau C, LeCabellec MT, Jezequel P, Meflah K and Vallette FM. The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet* 2002, **11**: 675-687.

Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F and Sipione S. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* 2001, **24**: 182-188.

Chandler JH, Reed TE and Dejong RN. Huntington's chorea in Michigan. *Neurology* 1960, **10**: 148-153.

Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K and Hardwick JM. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997, **278**: 1966-1968.

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T and Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001, **8**: 705-711.

Chou JJ, Li H, Salvesen GS, Yuan J and Wagner G. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 1999, **96**: 615-624.

Codogno P and Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2005, **12**: 1509-1518.

Connellan JM, Chung SI, Whetzel NK, Bradley LM and Folk JE. Structural properties of guinea pig liver transglutaminase. *J Biol Chem* 1971, **246**: 1093-1098.

Cooper JK, Schilling G, Peters MF, Herring WJ, Sharp AH, Kaminsky Z, Masone J, Khan FA, Delanoy M, Borchett DR, Dawson VL, Dawson TM and Ross CA. Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet* 1998, **7**: 783-790.

David CS Huang and Andreas Strasser. BH3-Only Proteins—Essential Initiators of Apoptotic Cell Death. *Cell* 2000, **103**: 839–842.

Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L and Bates GP. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 1997, **90**: 537-548.

Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G and Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia

homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 1996, **271**: 18188-18193.

Derossi D, Joliot AH, Chassaing G and Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994, **269**: 10444-10450.

Desagher S and Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2002, **10**: 369-377.

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP and Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997, **277**: 1990-1993.

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel J P, Carraway R, Reves SA et al. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 1995, **14**: 1075-1081.

Dorn BR, Dunn WA and Progulske-Fox A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* 2002, **4**: 1-10.

Dragovich T, Rudin CM and Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 1998, **17**: 3207-3213.

Dragunow M, Faull RL, Lawlor P, Beilharz EJ, Singleton K, Walker EB and Mee E. In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobe. *Neuroreport* 1995, **6**: 1053-1057.

Ellis HM and Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986, **44**: 817-829.

Ellis RE, Yuan JY and Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991, **7**: 663-698.

Elmore SP, Qian T, Grissom SF and Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J* 2001, **10**: 1096-1106.

Fadeel B, Orrenius S and Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **266**: 699-717.

Ferri KF and Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001, **3**: E255-263.

Fesus L and Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* 2002, **27**: 534-539.

Fesus L, Tarcsa E, Kedei N, Autuori F and Piacentini M. Degradation of cells dying by apoptosis leads to accumulation of epsilon(gamma-glutamyl)lysine isodipeptide in culture fluid and blood. *FEBS Lett* 1991, **284**: 109-112.

Fesus L and Thomazy V. Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* 1988, **231**: 119-134.

Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, Tarcsa E and Piacentini M. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* 1989, **245**: 150-154.

Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* 2001, **292**: 624-626.

Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG and Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem* 1999, **274**: 2225-2233.

Folk JE. Transglutaminases. *Annu Rev Biochem* 1980, **49**: 517-531.

Fraij BM and Gonzales RA. Organization and structure of the human tissue transglutaminase gene. *Biochim Biophys Acta* 1997, **1354**: 65-71.

Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S and Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* 2004, **23**: 3898-3904.

Gentile V, Davies PJ and Baldini A. The human tissue transglutaminase gene maps on chromosome 20q12 by in situ fluorescence hybridization. *Genomics* 1994, **20**: 295-297.

Gentile V, Saydak M, Chiocca EA, Akande O, Birckbichler PJ, Lee KN, Stein JP and Davies PJ. Isolation and characterization of cDNA clones to mouse macrophage and human endothelial cell tissue transglutaminases. *J Biol Chem* 1991, **266**: 478-483.

Goldsmith LA, Baden HP, Roth SI, Colman R, Lee L and Fleming B. Vertebral epidermal transamidases. *Biochim Biophys Acta* 1974, **351**: 113-125.

Gozuacik D and Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004, **23**: 2891-2906.

Grenard P, Bates MK and Aeschlimann D. Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase x and a novel gene family member, transglutaminase z. *J Biol Chem* 2001, **27**: 33066-33078.

Green H. Human genetic diseases due to codon reiteration: relationship to an evolutionary mechanism. *Cell* 1993, **74**: 955-956.

Green DR and Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004, **305**: 626-9.

Gross A, Pilcher K, Blanchly-Dyson E, Basso E, Jockel J, Bassi MC, Korsmeyer SJ and Forte M. Biochemical and genetic analysis of the mitochondrial response of yeast to BAX and BCL-X. *Mol Cell Biol* 2000, **20**: 3125-3316.

Hackam AS, Singaraja R, Wellington CL, Metzler M, McCutcheon K, Zhang T, Kalchman M and Hayden MR. The influence of huntingtin protein

size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol* 1998, **141**: 1097-1105.

Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne V, Culhane AC and Williams GT. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996, **237**: 884.

Hales KG, Fuller MT: Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 1997, **90**:121-129.

Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin. Sci. (Lond)* 1992, **83**: 639-648.

Hengartner MO, Ellis RE and Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992, **356**: 494-499.

Hengartner MO and Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994, **76**: 665-676.

Ho KC, Quarmby VE, French FS and Wilson EM. Molecular cloning of rat prostate transglutaminase complementary DNA. The major androgen-regulated protein DP1 of rat dorsal prostate and coagulating gland. *J Biol Chem* 1992, **267**: 12660-12667.

Holinger EP, Chittenden T and Lutz RJ. Bcl-2 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem* 1999, **274**: 13298-13304.

Huang WP, Scott SV, Kim J and Klionsky DJ. The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathway. *J Biol Chem* 2002, **275**: 5845-5851.

Huang DC and Strasser A. Bcl-2-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000, **103**: 839-842.

Hutchins MU and Klionsky DJ. Vacuolar localization of oligomeric  $\alpha$ -mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy

pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2001, **276**: 20491-20498.

Iannicola C, Moreno S, Oliverio S, Nardacci R, Ciofi-Luzzato A and Piacentini M. Early alterations in genes expression and cell morphology in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 2000, **75**: 830-839.

Ikura K, Nasu T, Yokota H, Tsuchiya Y, Sasaki R and Chiba H. Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence. *Biochemistry* 1988, **27**: 2898-2905.

Illarionov SN, Igarashi S, Onodera O, Markova ED, Nikolskaya NN, Tanaka H, Chabrashwili TZ, Insarova NG, Endo K, Ivanova-Smolenskaya IA and Tsuji S. Trinucleotide repeat length and rate of progression of Huntington's disease. *Ann Neurol* 1994, **36**: 630-635.

Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996, **21**: 83-86.

Jaroszewski L, Li W, Godzik A. In search for more accurate alignments in the twilight zone. *Protein Sci* 2002, **11**: 1702-1713.

Jiang X and Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 2000, **275**: 31199-31203.

Kaufmann SH and Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001, **11**: 526-534.

Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, et al. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* 2000, **20**: 7268-7278.

Kemataka S, Matsuura A, Wada Y and Ohsumi Y. Structural and functional analyses of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *Gene* 1996, **178**: 139-143.

Kim IG, Gorman JJ, Park SC, Chung SI and Steinert PM. The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase3) of human and mouse. *J Biol Chem* 1993, **268**: 12682-12690.

Kim IG, McBride OW, Wang M, Kim SY, Idler, WW and Steinert PM. Structure and organization of the human transglutaminase 1 gene. *J Biol Chem* 1992, **267**: 7710-7717.

Kim J, Dalton VM, Eggerton KP, Scott SV and Klionsky DJ. Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathway. *Mol Biol Cell* 1999, **10**: 1337-1351.

Kim J and Klionsky DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 2000, **69**: 303-342.

Kim SY, Grant P, Lee JH, Pant HC and Steinert PM. Differential expression of multiple transglutaminases in human brain. Increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2 in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1999, **274**: 30715-30721.

Kim YJ, Yi Y, Sapp E, Wang Y, Cuiffo B, Kegel KB, Qin ZH, Aronin N and Di Figlia M. Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**: 12784-12789.

Kirkegaard K, Taylor MP and Jackson WT. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganism. *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**: 301-314.

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 2003, **5**: 539-545.

Klionsky DJ and Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000, **290**: 1717-1721.

Klionsky DJ and Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev Dev Biol* 1999, **15**: 1-32.

Korsgren C, Lawler J, Lambert S, Speicher D and Cohen CM. Complete amino acid sequence and homologies of human erythrocyte membrane protein band 4.2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**: 613-617.

Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE and Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993, **4**: 327-332.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ and Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 2000, **7**: 1166-1173.

Kroemer G and Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000, **6**: 513-519.

Kroemer G, Zamzami N and Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997, **18**: 44-51.

Lardeux BR and Mortimore GE. Amino acid and hormonal control of macromolecular turnover in perfused rat liver. Evidence for selective autophagy. *J Biol Chem* 1987, **262**: 14514-14519.

Larsen KE and Sulzer D. Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol* 2002, **17**: 897-908.

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S and Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002, **2**: 183-192.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997, **91**: 479-489.

Li PF, Dietz R and von Harsdorf R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *Embo J* 1999, **18**: 6027-6036.

Liu S, Cerione RA and Clardy J. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**: 2743-2747.

Lorand L. DRPLA aggregation and transglutaminase, revisited. *Nat Genet* 1998, **20**: 231.

Lorand L and Conrad SM. Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* 1984, **58**: 9-35.

Lorand L and Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**: 140-156.

Lunkes A, Lindenberg KS, Ben-Haiem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL and Trotter Y. Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 2002, **10**: 259-269.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998, **94**: 481-490.

Malorni W, Rivabene R, Santini MT and Donelli G. N-acetylcysteine inhibits apoptosis and decreases viral particles in HIV-chronically infected U937 cells. *FEBS Lett* 1993, **327**: 75-78.

Martin SJ, Green DR and Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 1994, **19**: 26-30.

Martindale D, Hackam A, Wieczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi-Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F and Hayden MR. Length of huntingtin and its

polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* 1998, **18**: 150-154.

Mastroberardino PG, Iannicola C, Nardacci R, Bernassola F, De Laurenzi V, Melino G, Moreno S, Pavone F, Oliverio S, Fesus L and Piacentini M. Tissue transglutaminase ablation reduces neuromap death and prolongs survival in a mouse model of Huntington's disease. *Cell Death Differ* 2002, **9**: 873-880.

Matsuura A, Tsukada M, Wada Y and Ohsumi Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1997, **192**: 245-250.

McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP and Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 1990, **10**: 1901-1907.

Melino G, Annicchiarico-Petruzzelli M, Piredda L, Candi E, Gentile V, Davies P J and Piacentini M. Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 1994, **14**: 6584-6596.

Melino G and Piacentini M. 'Tissue' transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector? *FEBS Lett* 1998, **430**: 59-63.

Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA and Saikumar P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2001, **276**: 18361-18374.

Milligan CE and Schwartz LM. Programmed cell death during animal development. *Br Med. Bull* 1997, **53**: 570-590.

Mizushima N, Noda T and Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* 1999, **18**: 3888-3896.

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M and Ohsumi Y. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 1998, **395**: 395-398.

Moreau C, Cartron PF, Hunt A, Meflah K, Green DR, Evan G, Vallette F M and Juin P. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J Biol Chem* 2003, **278**: 19426-19435.

Mortimore GE, Miotto G, Venerando R and Kadowaki M. *Autophagy Subcell Biochem* 1996, **27**: 93-135.

Mozdy AD, McCaffery JM, Shaw JM: Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 2000, **151**:367-380.

Nakanishi K, Nara K, Hagiwara H, Aoyama Y, Ueno H and Hirose S. Cloning and sequence analysis of cDNA clones for bovine aortic-endothelial-cell transglutaminase. *Eur J Biochem* 1991, **202**: 15-21.

Nakamura N, Matsuura A, Wada Y and Ohsumi Y. Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* 1997, **121**: 338-344.

Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH and Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 2001, **153**: 1265-1276.

Niwa Y, Kato T, Tabata S, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K and Moriyasu Y Disposal of chloroplasts with abnormal function into the vacuole in *Arabidopsis thaliana* cotyledon cells. *Protoplasma* 2004, **223**: 229-232.

Noda T, Matsuura A, Wada Y and Ohsumi Y. Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **210**: 126-132.

Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**: 211-216.

Oliverio S, Amendola A, Rodolfo C, Spinedi A and Piacentini M. Inhibition of "tissue" transglutaminase increases cell survival by preventing apoptosis. *J Biol Chem* 1999, **274**: 34123-34128.

Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993, **74**: 609-619.

Onodera J and Ohsumi Y. Ald6p is a preferred target for autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2004, **279**: 16071-16076.

Pan G, O'Rourke K and Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998, **273**: 5841-5845.

Panov AV, Burke JR, Strittmatter WJ and Greenamyre T. In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca<sup>++</sup>-dependent depolarization of rat and human mitochondria: relevance to Huntington's disease. *Arch Biochem Biophys* 2002, **410**: 1-6.

Piacentini M, Ceru-Argento MP, Farrace, MG and Autuori F. Post-translational modifications of cellular proteins by polyamines and polyamine-derivatives. *Adv Exp Med Biol* 1988a, **231**: 185-198.

Piacentini M, Farrace MG, Piredda L, Matarrese P, Ciccocanti F, Falasca L, Rodolfo C, Giammarioli AM, Verderio E, Griffin M and Malorni W. Transglutaminase overexpression sensitizes neuronal cell lines to apoptosis by increasing mitochondrial membrane potential and cellular oxidative stress. *J Neurochem* 2002, **81**: 1061-1072.

Piacentini M, Martinet N, Beninati S and Folk JE. Free and protein-conjugated polyamines in mouse epidermal cells. Effect of high calcium and retinoic acid. *J Biol Chem* 1988b, **263**: 3790-3794.

Piacentini M, Sartori C, Beninati S, Bargagli AM and Ceru-Argento MP. Ornithine decarboxylase, transglutaminase, diamine oxidase and total diamines and polyamines in maternal liver and kidney throughout rat pregnancy. *Biochem J* 1986 **234**: 435-440.

Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL and Koliatsos VE. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 1995, **15**: 3775-3787.

Puthalakath H and Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 2002, **9**: 505-512.

Qin ZH and GU ZL. Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington disease *Acta Pharmacol Sin* 2004, **10**: 1243-1249.

Qin ZH, Wang Y, Sapp E, Cuiffo B, Erich Wanker E, Hayden MR et al. Huntingtin bodies sequester vesicle-associated proteins by a polyproline-dependent interaction. *J Neurosci* 2003, **24**: 269-281.

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelien EL, Mizushima N, Oshumi Y. et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003, **112**: 1809-1820.

Ravagnan L, Roumier T and Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002, **192**: 131-137.

Ravikumar B, Duden R and Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expression are degraded by autophagy. *Hum Mol Gen* 2002, **11**: 1107-1117.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG et al. Inhibition of m-TOR induces autophagy and reduce toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004, **36**: 585-595.

Read A P. Huntington's disease: testing the test. *Nat Genet* 1993, **4**: 329-330.

Reed JC and Kroemer G. Meccanisms of mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ* 2000, **7**:1145.

Reggiori F and Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 2002, **1**: 11-21.

Reik W, Collick A, Norris ML, Barton SC and Surani MA. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature* 1987, **328**: 248-251.

Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC and Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**: 14250-14255.

Rich K A, Burkett C and Webster P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol* 2003, **5**: 455-468.

Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackman A, Hayden MR, LiY, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C and Cattaneo E. Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 2000, **20**: 3705-3713.

Ringstad N, Gad H, Low P, Di Paolo G, Brodin L, Shupliakov O, De Cavilli P: Endophilin/SH3p4 is required for the transitino from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 1999, **24**:143-154.

Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**:2463-72.

Rodriguez J and Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999, **13**: 3179-3184.

Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A: Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci.* 2002, **115**:1663-1674.

Rosenberg NK, Sorensen SA and Christensen A. L. Neuropsychological characteristics of Huntington's disease carriers: a double blind study. *J Med Genet* 1995, **32**: 600-604.

Rothnagel JA and Rogers GE. Transglutaminase-mediated cross-linking in mammalian epidermis. *Mol Cell Biochem* 1994, **58**: 113-119.

Rubinsztein DC. Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet* 2002, **18**: 202-209.

Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 2001, **114**:867-874.

Sapp E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J et al. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's patients. *Ann Neurol* 1997, **42**: 604-612.

Sathasivan K, Hobbs C, Turmaine M, Mangiarini L, Mahal A, Bertaux F, Wanker EE, Doherty P, Davies SW and Bates GP. Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Hum Mol Genet* 1999, **8**: 813-822.

Sato T K, Darsow T and Emr SD. Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Mol Cell Biol* 1998, **18**: 5308-5319.

Sato TK, Rehling P, Peterson MR and Emr SD. Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion *Mol Cell* 2000, **6**: 661-671.

Sato M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y, Endo H,: Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **300**:482-493.

Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB and Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 1997, **275**., 983-986.

Saudou F, Finkbeiner S, Devys D and Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998, **95**: 55-66.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH and Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998, **17**: 1675-1687.

Schapiro A. H. Mitochondrial function in Huntington's disease: clues for pathogenesis and prospects for treatment. *Ann Neurol* 1997, **41**: 141-142.

Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H and Wanker EE. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 1997, **90**: 549-558.

Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Soling HD: Endophilin I mediates synaptic lysophosphatidic acid. *Nature* 1999, **401**:133-141.

Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB and Korsmeyer SJ. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**: 7834-7838.

Seglen PO and Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, **79**: 1889-1892.

Seglen PO, Gordon PB, Holen I and Hoyvik H. Hepatocytic autophagy. *Biomed Biochim Acta* 1991, **50**: 373-381.

Sever S, Muhlberg AB, Schmid SL: Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1999, 481-486.

Shaham, S and Horvitz HR. Developing *Caenorhabditis elegans* neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Genes Dev* 1996, **10**: 578-591.

Shintani T and Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004a, **306**: 990-995.

Sipione S and Cattaneo E. Modeling Huntington's disease in cells, flies, and mice. *Mol Neurobiol* 2001, **23**: 21-51.

Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 2001, **26**:23-29.

Slee EA, Adrain C and Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999a, **6**: 1067-1074.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR and Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999b, **144**: 281-292.

Smirnova E, Graparc L, Shurland DL, van der Blik AM. Dinamin-related protein Drp1 is required for mitochondria division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001, **12**:2245-2256.

Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Blik AM: A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 1998, **143**:351-358.

Squitieri F, Gellera C, Cannella M, Mariotti C, Cislaghi G, Rubinsztein D, Almqvist EW, Turner D, Bachoud-Lévi AC, Simpson SA, Delatycki M, Maglione V, Hayden MR. and Di Donato S. Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 2003, **126**: 946-955.

Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y and Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001, **410**: 112-116.

Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby L M, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed J C, Yin XM, Turk V and Salvesen GS. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 2001, **276**: 3149-3157.

Suzuki M, Youle RJ and Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000, **103**: 645-654.

Szewczyk A and Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev* 2002, **54**: 101-127.

Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM and Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 1999, **45**: 25-32.

Talloczy Z, Jiang W, Virgin HV, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL and Levine B. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 $\alpha$  kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**: 190-195.

Teter SA, Eggerton KP, Scott SV, Kim J, Fischer AM and Klionsky DJ. Degradation of lipid vesicles in the yeast requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem* 2001, **276**: 2083-2087.

Thomas LB, Gates DJ, Richfield EK, O'Brien TF, Schweitzer JB and Steindler DA. DNA end labeling (TUNEL) in Huntington's disease and other neuropathological conditions. *Exp Neurol* 1995, **133**: 265-272.

Thomenius MJ, Wang NS, Reineks EZ, Wang Z and Distelhorst CW. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3 only proteins. *J Bio Chem* 2003, **278**: 6243-50.

Trask BC, Broekelmann T, Ritty TM, Trask TM, Tisdale C and Mecham RP. Posttranslational modifications of microfibril associated glycoprotein-1 (MAGP-1). *Biochemistry* 2001, **40**: 4372-4380.

Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP and Davies SW. Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**: 8093-8097.

Ueno T, Tanida I and Kominami E. Autophagy and neuromuscular disease. *Autophagy* 2004, 264-268.

Van Sluijters DA, Dubbelhuis PF, Blommaart EF and Meijer AJ. Amino-acid-dependent signal transduction. *Biochem J.* 2000, **351**: 545-550.

Vieira HL, Boya P, Cohen I, El Hamel C, Haouzi D, Druillenec S, Belzacq AS, Brenner C, Roques B and Kroemer G. Cell permeable BH3-peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-X(L). *Oncogene* 2002, **21**: 1963-1977.

Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB and Korsmeyer SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000, **14**:2060-2071.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB and Korsmeyer S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001, **292**: 727-730.

Wellington CL, Ellerby LM, Hacham AS, Margolis LS, Trifiro MA, Singaraja R. et al. Caspase cleavage of gene product associated with triplet expansion disorders truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 1998, **273**: 9158-9167.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG and Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997, **139**: 1281-1292.

Wong ED, Wagner JA, Gorsich SW, McCaffery JM, Shaw JM, Nunnari J. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane-space protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria. *J Cell Biol* 2000, **151**:341-352.

Wozniak M, Fausto A, Carron CP, Meyer DM and Hruska KA. Mechanically strained cells of the osteoblast lineage organize their extracellular matrix through unique sites of  $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin expression. *J Bone Miner Res* 2001, **15**: 1731-1745.

Wyllie AH. Apoptosis: cell death under homeostatic control. *Arch Toxicol Suppl* 1987, **11**: 3-10.

Wyllie AH, Kerr JF and Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980, **68**: 251-30.

Xue L, Fletcher CG and Tolkovsky AM. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspase during apoptosis. *Curr Biol* 2001, **11**: 361-365.

Yaffe MP. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 1999, **283**:1493-1497.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB and Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995, **80**: 285-291.

Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE and Teller DC. Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 7296-7300.

Yuan J, Lipinski M and Degterev A. Diversity in the mechanism of neuronal cell death. *Neuron* 2003, **40**: 401-413.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM and Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993, **75**: 641-652.

Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ and Heintz N. Beclin1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**: 15077-15082.

Zou H, Henzel W J, Liu X, Lutschg A and Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997, **90**: 405-413.