



Università degli Studi di Firenze

DOTTORATO DI RICERCA IN
Farmacologia e Tossicologia

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Flavio Moroni

***Studi sull'omeostasi del NAD mitocondriale e sulla
modulazione farmacologica di processi NAD-dipendenti in
un modello murino di encefalomiopatia mitocondriale***

Settore Scientifico Disciplinare BIO-014

Dottoranda

Dott.ssa Felici Roberta

Tutore

Prof. Chiarugi Alberto

Anni 2010/2012

INDICE

INTRODUZIONE	5
LE MALATTIE MITOCONDRIALI	6
<i>Bioenergetica mitocondriale</i>	<i>7</i>
<i>Genetica mitocondriale.....</i>	<i>10</i>
<i>Malattie mitocondriali associate a mutazioni del DNA mitocondriale.....</i>	<i>12</i>
<i>Malattie mitocondriali associate a mutazioni del DNA nucleare</i>	<i>14</i>
<i>Approcci terapeutici.....</i>	<i>15</i>
<i>Modelli murini per lo studio delle malattie mitocondriali</i>	<i>17</i>
OMEOSTASI DEL NAD.....	21
<i>Biosintesi del NAD</i>	<i>22</i>
<i>Catabolismo del NAD.....</i>	<i>24</i>
<i>PARPs</i>	<i>25</i>
<i>MARTs.....</i>	<i>29</i>
<i>Sirtuine.....</i>	<i>31</i>
<i>CD38.....</i>	<i>33</i>
<i>La regolazione del NAD nei mitocondri</i>	<i>35</i>
SCOPO DELLA RICERCA.....	38
MATERIALI E METODI	42
<i>Colture cellulari.....</i>	<i>43</i>
<i>Shock termico.....</i>	<i>43</i>

<i>Misurazione della concentrazione di NAD</i>	43
<i>Separazione dei compartimenti cellulari</i>	44
<i>Saggio enzimatico per l'attività NMN-adenililtrasferasica</i>	44
<i>Western blotting</i>	45
<i>PCR, clonaggi e trasfezioni</i>	45
<i>Valutazione dell'effetto funzionale dell'upstream ORF</i>	47
<i>Immunocitochimica</i>	47
<i>Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale</i>	48
<i>Analisi strutturale dei prodotti del gene nmnat3</i>	48
<i>Valutazione dei contenuti di NAD mitocondriali con il mitoPARP-1cd</i> ..	49
<i>Immunoprecipitazione</i>	49
<i>Trattamento animali</i>	49
<i>Genotipizzazione e generazione della colonia di topi doppi knockout per Ndufs4 e PARP-1</i>	50
<i>Valutazione della progressione della malattia nei topi Ndufs4 KO</i>	51
<i>Analisi statistica</i>	51
RISULTATI	52
PARTE I: Studio dell'origine metabolica del NAD mitocondriale ...	53
<i>Identificazione delle varianti di NMNAT3 espresse nelle cellule umane</i>	53
<i>Effetto del silenziamento di NMNAT1 e -3 sull'attività NMNAT e sul contenuto di NAD intracellulare</i>	58
<i>Effetto dell'overespressione delle due isoforme di NMNAT3 sull'attività NMNAT e sull'omeostasi del NAD</i>	62
<i>Ulteriori tentativi per identificare la proteina NMNAT3 endogena</i>	68
<i>Effetto del NAD esogeno e dei suoi precursori sul contenuto di NAD cellulare e mitocondriale in cellule overesprimenti FKSG76</i>	73

**PARTE II: Modulazione farmacologica della poli(ADP)ribosilazione
in un modello murino di encefalomiopatia mitocondriale 75**

*Effetto del trattamento con il pan-inibitore PARP KU-0058948 sulla
progressione della malattia in topi deficienti per Ndufs4.....75*

*Valutazione dell'attivazione PARP e dei livelli di NAD nel cervello di topi
deficienti per Ndufs478*

*Generazione e caratterizzazione del fenotipo di topi doppi knockout per
Ndufs4 e PARP180*

DISCUSSIONE 84

BIBLIOGRAFIA..... 93

PRODUZIONE SCIENTIFICA..... 104

INTRODUZIONE

LE MALATTIE MITOCONDRIALI

Le malattie mitocondriali rappresentano un gruppo eterogeneo di sindromi cliniche accomunate da un deficit energetico del metabolismo mitocondriale, causate da mutazioni ereditarie o spontanee del DNA mitocondriale (mtDNA) o del DNA nucleare (nDNA) codificante proteine coinvolte nel funzionamento mitocondriale (Wallace, 1999). Dal momento che il mitocondrio provvede alla maggior parte della produzione energetica cellulare, i deficit mitocondriali affliggono preferenzialmente il funzionamento di tessuti ad elevata richiesta energetica come cervello, muscolo, cuore e sistema endocrino. Difetti energetici sono associati a forme di cecità, sordità, disordini nel movimento, demenza, cardiomiopatie, miopatie, disfunzioni renali e all' invecchiamento

Sebbene le malattie mitocondriali siano considerate malattie genetiche rare, studi epidemiologici rivelano che la frequenza delle sole patologie associate a mutazioni del mtDNA è nell'ordine di 1:5000 (Schaefer et al., 2004) e che mutazioni del mtDNA sono rilevabili nel cordone ombelicale di un neonato su 200 (Elliott et al., 2008). Inoltre, mutazioni del nDNA che influenzano geni mitocondriali sembrerebbero essere ancora più comuni rispetto a quelle a carico del mtDNA (Wallace et al., 2010). Perciò, il background genetico della disfunzione energetica è verosimilmente enorme.

Poiché i mitocondri sono considerati i maggiori responsabili della produzione energetica cellulare, la comprensione della fisiopatologia delle malattie mitocondriali e lo sviluppo di nuove terapie non può prescindere dalla conoscenza e dallo studio della biologia del mitocondrio.

Un ampio spettro di complesse manifestazioni cliniche è stato collegato a mutazioni di geni mitocondriali. Come mutazioni molto diverse possono causare

una serie simile di fenotipi, mutazioni nello stesso gene possono dare luogo ad una varietà di sindromi cliniche e la stessa mutazione nel mtDNA a differenti livelli di eteroplasmia può provocare fenotipi totalmente diversi.

Bioenergetica mitocondriale

La produzione di energia negli organismi multicellulari è basata sulla disponibilità di equivalenti riducenti (idrogeni), originati dal catabolismo di carboidrati e grassi, che reagiscono con l'ossigeno molecolare per generare acqua attraverso la fosforilazione ossidativa mitocondriale (OXPHOS). (Fig. 1)

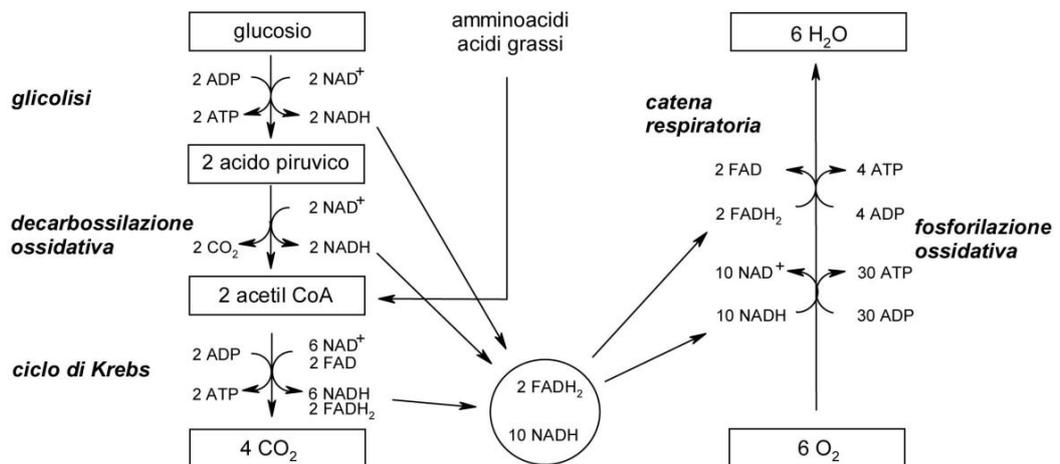


Fig.1 Rappresentazione schematica della respirazione cellulare

Il glucosio è trasformato in piruvato attraverso la glicolisi nel citosol, riducendo il NAD⁺ citosolico a NADH (nicotinamide adenina dinucleotide ridotto). Il piruvato così generato entra nel mitocondrio mediante l'azione della piruvato deidrogenasi, convertito in acetil-CoA, NADH + H⁺ e CO₂. L'acetil-CoA, entra così nel ciclo degli acidi tricarbossilici, che rimuove idrogeni dagli acidi organici,

generando NADH e H⁺. Gli acidi grassi sono ossidati interamente nel compartimento mitocondriale attraverso la beta ossidazione, generando acetyl-CoA mitocondriale, NADH + H⁺ e FADH₂. Due elettroni sono trasferiti dal NADH alla NADH deidrogenasi (complesso I) o dal FADH₂ tramite la succinato deidrogenasi (complesso II) per ridurre l'ubiquinone (coenzima Q₁₀) a ubisemiquinone e, quindi a ubiquinolo (**Fig. 2**). Gli elettroni poi dall'ubiquinolo sono trasferiti alla la parte restante della catena di trasporto degli elettroni, passando attraverso il complesso III (complesso bc₁), il citocromo c, il complesso IV (citocromo c ossidasi o COX) e infine all'ossigeno molecolare per generare acqua. L'energia liberata durante il flusso degli elettroni nella catena respiratoria è usata per pompare protoni all'esterno della membrana interna mitocondriale attraverso i complessi I, III e IV. Questo fenomeno crea un gradiente elettrochimico di protoni ($\Delta\psi$), generando un ambiente acido e positivo nello spazio intermembrana e alcalino e negativo nella matrice mitocondriale. L'energia potenziale fornita dal gradiente protonico è usata per molteplici scopi::

- 1) importare proteine e Ca²⁺ nel mitocondrio
- 2) per generare calore
- 3) per sintetizzare ATP nella matrice mitocondriale

L'energia per convertire ADP e Pi a ATP origina dal flusso di protoni attraverso l'ATP sintetasi (complesso V) nella matrice. L'ATP di matrice viene così continuamente scambiato con ADP citosolico dal trasportatore dei nucleotidi adenilici (ANT) presente sulla membrana interna mitocondriale. L'efficienza con cui gli equivalenti riducenti sono convertiti ad ATP dalla OXPHOS è nota come *efficienza di accoppiamento*.

Mutazioni delle proteine mitocondriali modificano l'efficienza di accoppiamento della OXPHOS, influenzando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), modulando l'uptake di Ca^{2+} e il meccanismo apoptotico.

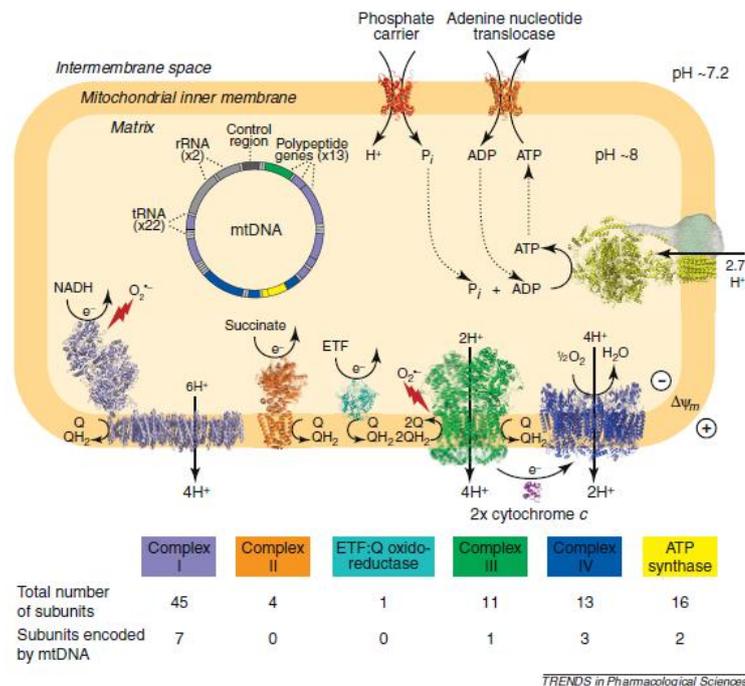


Fig. 2 Catena di trasporto degli elettroni e fosforilazione ossidativa

Il mitocondrio è costituito da proteine codificate sia dal mtDNA che dal nDNA. Il complesso I della OXPHOS è formato da 45 polipeptidi, dei quali 7 (ND1, -2, -3, -4, -4L, -5, -6) sono codificati dal mtDNA; il complesso II da 4 polipeptidi codificati dal nDNA; il complesso III da 11 proteine, delle quali 1 (il citocromo b) è codificato dal mtDNA; il complesso V da circa 16 polipeptidi, dei quali 2 (ATP6 e -8) codificati dal mtDNA. Dei 5 complessi solo il I, il III, il IV e il V trasportano protoni e sono proprio quei complessi che conservano polipeptidi codificati da mtDNA.

(L) ricco di residui citosinici e un filamento pesante (H) ricco di residui guanidici. Nei mammiferi, il riarrangiamento genico è conservato e, oltre ai geni strutturali, il mtDNA contiene una regione di regolazione comprendente i promoters per la trascrizione di entrambi i filamenti e l'origine di replicazione del filamento H. L'origine di replicazione del filamento L, invece, è situata a due terzi della sequenza in direzione oraria. Tutti i geni codificanti rRNA e proteine sono situati sul filamento H, fatta eccezione per l'ND6, situato sul filamento L. I tRNA punteggiano i geni e i trascritti maturi sono quindi generati dal trascritto policistronico attraverso il clivaggio dei tRNA, seguito dalla poliadenilazione degli rRNA e mRNA (Anderson et al., 1981). I geni del mtDNA hanno una frequenza di mutazioni molto più alta rispetto ai geni del nDNA e una ragionevole motivazione può essere la loro prossimità al sito di produzione dei ROS (Schriner et al., 2000).

Ogni cellula di mammifero contiene centinaia di mitocondri e migliaia di molecole di mtDNA. Quando si verifica una mutazione nel mtDNA, si crea una popolazione mista contenente mtDNA normale e mutato, dando luogo ad una condizione denominata eteroplasmia. Quando una cellula eteroplasmica si divide, mtDNA normale e mutato si distribuiscono casualmente nelle cellule figlie, con la possibilità di generare mutanti puri o wild type, una condizione definita omoplasia (Wallace, 2007). All'aumento della percentuale di mtDNA mutato corrisponde il declino della funzione energetica. Quando la produzione di energia è insufficiente per il normale funzionamento del tessuto, si supera il limite, i sintomi appaiono e possono avere inizio processi apoptotici o necrotici (Wallace, 2005).

Il mtDNA umano è strettamente a trasmissione materna (Giles et al., 1980). E' stata riportata solo un'eccezione in un individuo che ha sviluppato una miopatia mitocondriale. Il suo tessuto muscolare conteneva alcune molecole di mtDNA

ereditate dal padre, caratterizzate da una mutazione deleteria (Schwartz and Vissing, 2002)

Malattie mitocondriali associate a mutazioni del DNA mitocondriale

Le varianti del mtDNA clinicamente rilevanti possono essere suddivise in tre classi (Wallace, 2005):

- a) Mutazioni deleterie che causano una patologia a trasmissione materna
- b) Varianti adattative che predispongono gli individui a patologie in ambienti differenti
- c) Accumulo di mutazioni somatiche a carico del mtDNA associato all'invecchiamento.

Mutazioni patogenetiche del mtDNA comprendono sia sostituzioni di base che riarrangiamenti genici.

Le sostituzioni di base possono essere suddivise in mutazioni missenso che interessano i 13 geni del mtDNA codificanti proteine e mutazioni che riguardano i geni per rRNA o tRNA, le quali hanno un effetto globale sulla sintesi delle proteine mitocondriali. Mutazioni di geni codificanti polipeptidi sono alla base della patogenesi di un ampio spettro di manifestazioni cliniche come la neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHNO) (Wallace et al., 1988a), la sindrome di Leigh (Holt et al., 1990) e la miopatia mitocondriale (Andreu et al., 1998). Mutazioni nei tRNA e rRNA che provocano alterazioni della sintesi proteica mitocondriale possono risultare in patologie multisistemiche come l'epilessia mioclonica con fibre rosse stracciate (MERRF) (Wallace et al., 1988b), encefalopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi tipo stroke (MELAS) (Goto et al., 1990), encefalomiopatia, miopatia mitocondriale e intolleranza all'esercizio, oftalmoplegia esterna progressiva cronica (CPEO), la sindrome di

Kearns Sayre, sindrome gastrointestinale, distonia, diabete, sordità, cardiomiopatia, disturbi renali, morbo di Alzheimer e Parkinson (Wallace, 2005).

I riarrangiamenti genici possono essere sia delezioni de novo che inserzioni a trasmissione materna in grado di generare delezioni in cellule postmitotiche. La maggior parte delle delezioni causa la rimozione di almeno un tRNA, modificando l'intero processo di sintesi proteica (Wallace et al., 2010). Le sindromi associate a riarrangiamento del mtDNA sono eteroplasmiche e possono risultare in un range di manifestazioni cliniche con diverso grado di severità. I fenotipi meno severi associati a riarrangiamento del mtDNA sono rappresentati da diabete di tipo 2 a trasmissione materna e sordità, mentre le patologie più gravi comprendono la CPEO e la KSS associata ad oftalmoplegia, ptosi e miopatia mitocondriale con fibre rosse stracciate (RRFs). La RRFs è spesso associata alla presenza nel muscolo scheletrico di fibre COX-negative e succinato deidrogenasi iperattive che contengono elevate concentrazioni di mtDNA riarrangiato (Mita et al., 1989;Wallace, 2005). La più severa manifestazione clinica dovuta a riarrangiamento del mtDNA è la sindrome di Pearson. I pazienti affetti da questa patologia sviluppano pancitopenia nei primi anni di vita e diventano completamente dipendenti dalle trasfusioni (Kapsa et al., 1994). Se riescono a sopravvivere alla pancitopenia, la patologia si evolve in KSS (Rotig et al., 1995)..La differenza nei fenotipi associati a riarrangiamento del mtDNA sembra derivare dalle differenze tra inserzioni e delezioni, dal tipo di tessuto interessato dal riarrangiamento e dalla percentuale di mtDNA mutato per ogni tessuto (Wallace et al., 2010).

Malattie mitocondriali associate a mutazioni del DNA nucleare

Mutazioni di geni nucleari codificanti proteine appartenenti alla OXPHOS sono state associate ad un'ampia varietà di patologie multisistemiche, che spaziano da malattie letali nell'infanzia come la sindrome di Leigh alla predisposizione verso la depressione (**Tabella 1**).

Gene name	Function	Chromosome	Inheritance	Clinical phenotype
<i>NDUFS8</i>	Complex I	11q13	AR	Leigh syndrome
<i>SURF1</i>	Complex IV assembly	9q34	AR	Leigh syndrome
<i>C10ORF2 (PEOA3)</i>	Twinkle helicase, mtDNA stability	10q24	AD	AD-PEO, SANDO syndrome
<i>POLG (PEOA1)</i>	Polymerase gamma mtDNA replication, mtDNA stability	15q25	AD-AR	Alpers syndrome, AD and AR-PEO, SANDO syndrome, SCAE
<i>ANT1 (PEOA2)</i>	Adenine nucleotide translocator isoform 1, mtDNA stability	4q35	AD-AR	PEO, multiple mtDNA deletions
<i>DGUOK</i>	Deoxyguanosine kinase, mitochondrial dNTP pool maintenance	2p13	AR	Hepatocerebral mtDNA depletion syndrome
<i>TK2</i>	Thymidine kinase, mitochondrial dNTP pool maintenance	16q22	AR	Myopathic mtDNA depletion
<i>SUCLA2</i>	Succinate-CoA ligase	13q12	AR	Leigh-like, dystonia, mild methylmalonic aciduria, mtDNA depletion
<i>ECGF1</i>	Thymidine phosphorylase, mtDNA stability	22q13	AR	MNGIE, multiple mtDNA deletions, depletion
<i>OPA1</i>	Dynamin-related protein	3q28-q29	AD	AD-optic atrophy
<i>MFN2</i>	Mitofusin, mitochondrial fusion	1p36-p35	AD	Charcot-Marie-Tooth disease 2A2

Tabella 1 Esempi di mutazioni a livello del nDNA che causano malattie mitocondriali

Queste mutazioni includono:

1. mutazioni nei geni codificanti proteine strutturali o coinvolte nell'assemblaggio dei complessi della OXPHOS (Procaccio and Wallace, 2004;Zhu et al., 1998)

2. mutazioni nei geni codificanti enzimi coinvolti nella biogenesi mitocondriale come, ad esempio POLG (Spelbrink et al., 2001; Van et al., 2001)
3. mutazioni nel metabolismo dei nucleosidi o nucleotidi (Palmieri et al., 2005; Saada et al., 2001)
4. mutazioni in geni coinvolti della fusione o nella fissione mitocondriale (Delettre et al., 2000; Zuchner et al., 2004)

Approcci terapeutici

Nonostante i recenti progressi nella comprensione dei difetti genetici alla base dello sviluppo delle malattie mitocondriali, le terapie per il trattamento di queste gravi patologie restano ancora estremamente limitate. Una recente ricerca pubblicata dalla "Cochrane collaboration" (Pfeffer et al., 2012) ha valutato i risultati di numerosi studi clinici controllati randomizzati sull'effetto sia di trattamenti farmacologici che non farmacologici (vitamine e integratori alimentari), e dell'esercizio fisico, in pazienti con malattie mitocondriali. L'analisi include in primo luogo la valutazione del miglioramento della forza muscolare, della resistenza o dei sintomi neurologici; in secondo luogo la qualità della vita, markers biochimici della patologia e possibili effetti negativi. In seguito alla revisione di circa 1335 articoli, gli autori hanno concluso che *attualmente non esiste alcuna evidenza a supporto dell'uso delle terapie proposte per i pazienti mitocondriali* e che, quindi, sono necessari ulteriori studi per stabilire l'efficacia di questi approcci terapeutici.

L'assenza di una cura, però, non coincide con la mancanza di trattamenti ed una ***terapia sintomatica*** può risultare realmente efficace in pazienti affetti da malattie mitocondriali. Tra le manifestazioni più comuni della encefalopatia mitocondriale, le convulsioni, ad esempio, solitamente rispondono agli antiepilettici

convenzionali. Tuttavia, l'acido valproico dovrebbe essere usato in associazione con L-carnitina, perché in grado di inibire il suo uptake (Tein et al., 1993). Nei pazienti con oftalmoplegia progressiva esterna, la chirurgia può migliorare la ptosi, anche se non in modo permanente. Anche la cataratta congenita può essere trattata chirurgicamente. Il diabete mellito, insulino-dipendente o non insulino-dipendente, risponde positivamente alla dieta e alla terapia farmacologica. Se effettuato per tempo, l'impianto di un pacemaker può salvare la vita ai pazienti con KSS. Al contrario, il trapianto di cuore in pazienti con cardiomiopatie associate ad una patologia multisistemica è un argomento controverso, giustificato solo quando il coinvolgimento cardiaco è il problema predominante o esclusivo del paziente (Bohlega et al., 1996; Santorelli et al., 2002). I pazienti con perdita dell'udito neurosensoriale possono trarre benefici dall'impianto cocleare (Sue et al., 1998). L'insufficienza epatica, spesso associata a malattie derivanti da mutazioni nel mtDNA, potrebbe essere risolta da un trapianto di fegato (Dubern et al., 2001). E' stata osservata una mioglobinuria ricorrente in pazienti con deficienza primaria di coenzima Q10 o con mutazioni nel mtDNA di geni codificanti proteine. Durante gli episodi acuti, tutti i pazienti dovrebbero essere reidratati e soggetti a dialisi quando la mioglobinuria è complicata da insufficienza renale. Farmaci psicotropi sono efficaci in pazienti con sintomi psichiatrici (in particolar modo depressione), che non sono così infrequenti nei pazienti mitocondriali (Kiejna et al., 2002).

Vari cocktail di vitamine e cofattori sono usati in pazienti con encefalomiopatie mitocondriali, che comprendono riboflavina (vitamina B2), tiamina (vitamina B1), acido folico, CoQ10, L-carnitina, e creatina. Tutti questi sono composti naturali e sono presumibilmente privi di effetti collaterali alle dosi utilizzate. Alcuni come la riboflavina e il coenzima Q10 sono componenti della catena respiratoria, ma non

ci sono evidenze di una loro carenza in seguito a malattie mitocondriali primarie (Matsuoka et al., 1991).

Modelli murini per lo studio delle malattie mitocondriali

Gli studi sui pazienti hanno rivelato molti particolari sugli aspetti genetici delle malattie mitocondriali, ma i meccanismi fisiopatologici alla base del complesso quadro clinico delle patologie rimangono tuttora sconosciuti. Nuove informazioni sono state recentemente ottenute mediante lo studio dei modelli murini di malattie mitocondriali, alcuni dei quali sono descritti di seguito.

Topi deficienti per AIF (Topi arlecchino). L'apoptosis-inducing factor (AIF) è una flavoproteina dello spazio intermembrana (Susin et al., 1999) che contribuisce all'apoptosi (Cande et al., 2002) e svolge un ruolo importante nella sopravvivenza cellulare mantenendo la struttura mitocondriale (Cheung et al., 2006). Sebbene AIF non faccia parte del Complesso I, sembra svolgere un ruolo cruciale per la sua biogenesi e/o per il suo mantenimento (Benit et al., 2008a). I topi arlecchino possiedono un'inserzione ectopica nell'introne 1 del gene per AIF sul cromosoma X, che causa una diminuzione dell'80% dell'espressione di AIF e una sostanziale riduzione dell'attività del complesso I (Klein et al., 2002a). Dal punto di vista clinico, maschi eterozigoti e femmine omozigote per l'allele mutato mostrano un fenotipo eterogeneo, con un'ampia variabilità nell'esordio e nella severità dei sintomi (Benit et al., 2008b). Alla nascita, i topi arlecchino perdono completamente il pelo, che poi ricresce in seguito in modo irregolare, a macchie. Il peso alla nascita è molto basso, e subisce un ulteriore decremento intorno ai 6 mesi di vita (Benit et al., 2008b). Si sviluppa intorno ai 3 mesi di vita una progressiva atassia cerebellare, con perdita di neuroni cerebellari in circa l'8% dei topi (Benit et al., 2008b). Questi topi hanno un rischio molto elevato di

sviluppare cardiomiopatie ipertrofiche e sono altamente sensibili al danno da ischemia/riperfusion (van Empel et al., 2005a). Presentano patologie oculari rappresentate da ipoplasia oculare nel 20% dei topi e assenza del nervo ottico nel 40% (Klein et al., 2002b;van Empel et al., 2005b). Analisi biochimiche mostrano una riduzione dell'attività del complesso I nel cervelletto, nel cervello, nel muscolo scheletrico, nella retina, nel nervo ottico e, in minor misura, nel midollo spinale e nel rene. L'attività del complesso I rimane invece inalterata nel cuore, nel fegato e nei testicoli. A livello istologico, i topi arlecchino risultano normali fino a 3 mesi di vita. A 4 mesi si evidenziano i primi segni di una precoce degenerazione neuronale e astrogliosi con estesa proliferazione vascolare (Klein et al., 2002b). Le femmine eterozigote sono invece istologicamente e clinicamente normali fino a 26 mesi di vita. (Klein et al., 2002b).

Topi Ndufs4 knockout. Recentemente, il gruppo del Prof. Palmiter ha sviluppato un modello di deficit del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, attraverso la delezione del secondo esone del gene per la proteina NADH ubiquinone Fe-S 4 (Ndufs4) (Kruse et al., 2008). Nell'uomo, il gene Ndufs4, localizzato sul cromosoma 5, codifica una subunità del complesso I di 18 KDa, coinvolta nel corretto assemblaggio dell'intero complesso (Loeffen et al., 2000). Pazienti che presentano mutazioni di questo gene sono caratterizzati da una patologia simile alla sindrome di Leigh che li porta a morte entro il sedicesimo mese di vita (Anderson et al., 2008;Leshinsky-Silver et al., 2009;Petruzzella and Papa, 2002). Topi eterozigoti per il gene NDUFS4 mutato sono indistinguibili da topi wild-type. Al contrario, topi knockout (KO) per NDUFS4 (**Fig. 4**) sono caratterizzati da ritardo nella crescita e perdita reversibile del pelo, ma non presentano ulteriori sintomi fino alla quarta/quinta settimana di vita. A partire dal trentesimo giorno dopo la nascita (P30) i topi KO diventano letargici e incapaci di mantenere la temperatura corporea (~2°C più bassa rispetto a topi wild-type). Dal

P35 mostrano una severa atassia e debolezza muscolare. Alcuni NDUFS4 KO hanno inoltre difetti della vista (possono sviluppare la cataratta e/o essere incapaci di aprire gli occhi completamente) e, a partire dal P35, perdono l'udito. Circa il 30% di questi topi, inoltre, sviluppano epilessia. Tra P30 e P50 smettono di nutrirsi e acquistare peso, mostrano un peggioramento dell'atassia e, infine, muoiono intorno a P60 (Kruse et al., 2008).



Fig.4. Fenotipo dei topi Ndufs4 Knockout

I livelli di lattato nel siero degli animali che hanno raggiunto uno stadio avanzato della malattia risulta essere leggermente aumentato. La glicemia a digiuno è normale. La valutazione biochimica dell'attività dei complessi della catena respiratoria nel fegato rivela circa la metà di attività per il complesso I e attività inalterata per gli altri complessi ad eccezione di una lieve diminuzione dell'attività del complesso III. L'elettroforesi in condizioni native mostra che la quantità di complesso I assemblato correttamente è ridotta nei topi KO. D'altro canto, il consumo di ossigeno e la produzione di ATP in condizioni basali sono paragonabili a topi di controllo. Un'analisi mediante Southern Blot indica un normale numero di genoma mitocondriale. La valutazione microscopica del

cervello, cervelletto, tronco encefalico e dell'occhio non rivela differenze tra topi KO e WT.

Topi deficienti per Tfam. L'inattivazione del gene codificante il fattore di trascrizione mitocondriale Tfam può simulare un modello di delezione del mtDNA. (Larsson et al., 1998). Topi eterozigoti per Tfam sono vitali e in grado di riprodursi, mostrano una riduzione del 50% del trascritto e dei livelli di proteina per Tfam, del 34% per il numero di copie del mtDNA, del 22% dei livelli di trascritto mitocondriale e una parziale riduzione dei livelli della COX nel cuore, ma non nel fegato. I topi knockout per Tfam, invece, muoiono intorno all'ottavo/decimo giorno di gestazione (E8/E10) e mostrano una delezione completa della proteina Tfam e livelli bassissimi di mtDNA. I mitocondri di questi topi sono più grandi del normale e presentano creste di forma anomala, sono deficienti per la COX, ma non per l'SDH (Larsson et al., 1998).

OMEOSTASI DEL NAD

Durante il secolo scorso, numerosi scienziati contribuirono alla scoperta della nicotinamide adenin dinucleotide (NAD) ed alla comprensione della sua struttura e funzione. Tra questi, quattro premi Nobel: Sir Arthur Harden, che nel 1904 identificò nell'estratto di lievito un composto di basso peso molecolare (cozimasi), indispensabile per l'attività degli enzimi della fermentazione, Hans von Euler-Chelpin, che nel 1920 descrisse la — cozimasi — come l'insieme dei nucleotidi NMN ed AMP, Otto Warburg, che nel 1936 scoprì la funzione del NAD di trasferire idrogeno da una molecola ad un'altra e Arthur Kornberg, che nel 1948 ne descrisse la sintesi, cioè l'unione di NMN ed AMP da parte dell'enzima NMNAT (Berger et al., 2004).

Oggi il NAD (insieme al suo analogo fosforilato NADP) è considerato la principale molecola responsabile del trasferimento di elettroni in molteplici reazioni di ossidoriduzione (Di Lisa and Ziegler, 2001). Dal momento che la maggior parte delle vie metaboliche necessita di questi nucleotidi piridinici come cofattori, essi svolgono senza dubbio un ruolo chiave nel metabolismo energetico.

Durante gli ultimi anni abbiamo assistito ad un rinnovato interesse per la biosintesi del NAD (Berger et al., 2004; Magni et al., 2008). Questo perché l'omeostasi del NAD non dipende esclusivamente dalla sua semplice conversione nella corrispondente forma ridotta (NAD⁺/NADH) ma anche dalla sua irreversibile trasformazione in una numerosa serie di metaboliti che svolgono un ruolo chiave in diversi processi di segnalazione cellulare (Berger et al., 2004; Houtkooper and Auwerx, 2012). Sono stati infatti identificati numerosi enzimi che utilizzano NAD come substrato per la loro attività enzimatica, quali le poli(ADP-ribosio)polimerasi (PARPs), le mono(ADP-ribosio)transferasi (MARTs), le sirtuine e la NADasi CD38. Numerose ricerche si stanno ora concentrando sulla comprensione del ruolo fisiopatologico di questi enzimi, con particolare

attenzione allo sviluppo di tools farmacologici che permettano la modulazione della loro attività per eventuali scopi terapeutici (Belenky et al., 2007; Chiarugi et al., 2012; Houtkooper and Auwerx, 2012; Sauve, 2008).

Recenti evidenze dimostrano che è proprio la disponibilità di NAD all'interno dei distinti compartimenti cellulari a regolare l'attività degli enzimi NAD dipendenti (Bai et al., 2011b; Pittelli et al., 2011). Il concetto che, al contrario di quanto precedentemente sostenuto, anche le reazioni metaboliche -le ossidoriduzioni NAD-dipendenti- siano limitate dalle concentrazioni di NAD intracellulare, amplia notevolmente le potenziali applicazioni terapeutiche della modulazione del NAD intracellulare (Houtkooper and Auwerx, 2012).

Biosintesi del NAD

Poiché continuamente degradato durante l'attività fisiologica degli enzimi menzionati in precedenza, il NAD deve essere necessariamente re-sintetizzato. Lo step comune a tutte le vie di sintesi del NAD è la formazione di un dinucleotide composto da una molecola di AMP (la porzione adenilica dell'ATP) e un mononucleotide piridinico, l'NMN (nicotinamide mononucleotide) o l'acido nicotinico mononucleotide (NAMN) (**Fig. 5**)

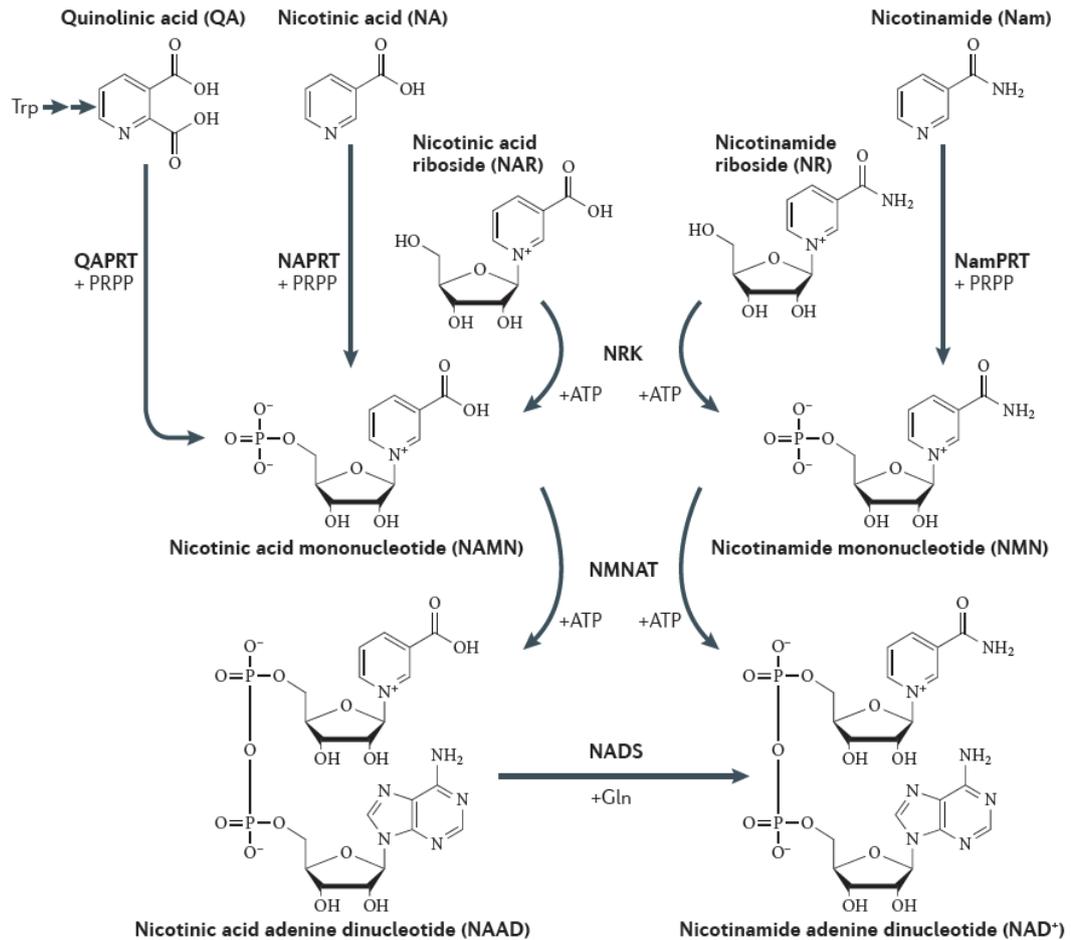


Fig.5 Rappresentazione schematica delle possibili vie di sintesi del NAD nelle cellule eucariotiche.

Le nucleobasi (come la nicotinamide (Nam) o l'acido nicotinic (NA) chiamati collettivamente vitamina B3 o niacina) o i nucleosidi (Nam riboside NR o NA riboside (NAR) sono convertiti nei corrispondenti mononucleotidi, NMN e NAMN: Nam e NA dalle fosforibosiltrasferasi e NR e NAR dalle nicotinamide riboside chinasi (NRKs) (Bieganowski and Brenner, 2004). Lo step successivo, che è la trasformazione del mononucleotide in dinucleotide, è operata dalle NMN adeniltrasferasi (NMNATs) ed è comune a tutte le vie di sintesi (Fig). Nei mammiferi, ci sono 3 isoforme distinte di NMNAT che hanno differente distribuzione tissutale e distinta localizzazione intracellulare (Berger et al., 2005;Lau et al., 2010). Mentre l'NMNAT1 ha localizzazione nucleare ed è

espressa in modo ubiquitario in tutti i tessuti, l'NMNAT2 è localizzata a livello dell'apparato del Golgi ed è espressa maggiormente nel cervello (Raffaelli et al., 2002). Recentemente è stata identificata l'isoforma NMNAT3, localizzata nei mitocondri, i cui livelli di espressione sono minori rispetto all'isoforma 1. Sembra essere espressa in modo ubiquitario, ma maggiormente nel polmone e nella milza ed in misura minore nella placenta e nel rene (Zhang et al., 2003)

Nella classica *via di Preiss-Handler* il NAD viene sintetizzato a partire dall'NA. Questa via è predominante negli organismi unicellulari e necessita dell'amidazione finale dell'acido nicotinico da parte della NAD sintetasi (Fig). Nel mammifero, anche il triptofano può essere utilizzato per generare NAD attraverso la via delle chinurenine o via de novo (Fig) ma, contrariamente alla niacina, non è in grado da solo di mantenere livelli fisiologici di NAD. La maggior parte del NAD nell'uomo è sintetizzata a partire dalla Nam nella *via di salvataggio*. La conversione della Nam a NAD attraverso la Nam fosforibosiltrasferasi è la via più diretta ed economica. La nicotinamide che viene rilasciata nelle reazioni NAD dipendenti, infatti, può tramite la NamPRT essere totalmente riciclata per mantenere i livelli di NAD tissutali. La NamPRT è stata identificata come l'enzima limitante la biosintesi del NAD nei mammiferi.

Catabolismo del NAD

Quattro famiglie distinte di enzimi utilizzano il NAD come substrato: le poli(ADP-ribosio)polimerasi, le mono(ADP-ribosil)trasferasi, le NADasi e le sirtuine. Questi enzimi sono in grado di scindere il legame glicosidico tra NAM e la porzione ribosidica del NAD e sono responsabili della breve emivita del NAD (1-10 ore)(Houtkooper and Auwerx, 2012;Sauve, 2008).

PARPs

Quella della *poli (ADP ribosio) polimerasi (PARPs)* è una superfamiglia di enzimi scoperta per la prima volta nel 1963 dal gruppo di Mandel, a Strasburgo (Chambon et al., 1963). La sua identificazione ha prodotto un interesse biologico crescente ed ha aperto uno dei campi più innovativi e competitivi del panorama scientifico attuale. Ad oggi si conoscono circa 16 isoforme PARP, e ben 18 geni codificanti per tali enzimi, suddivisi in 3 gruppi: le “PARP-1 like”, enzimi la cui attivazione è dipendente da un danno al DNA, le Tankirasi e le Macro-PARPs.

Di questa famiglia, l'enzima più rappresentativo è la PARP-1, una proteina nucleare molto rappresentata, attivata dal danno al DNA. La principale attività catalitica della PARP-1 e simili è quella di trasferire, in seguito all'attivazione da parte di un danno al DNA, una prima unità di ADP-ribosio dal NAD ad un residuo di glutammato di una proteina bersaglio; quindi, questa prima molecola di ADP-ribosio, viene legata con altre analoghe attraverso un legame O-glicosidico tra l'ossigeno in C-2' della prima unità di ribosio e il carbonio in C-1'' della seconda unità di NAD che è stata privata della nicotinamide. La reazione prosegue per addizione successiva di monounità, fino all'ottenimento di un biopolimero la cui catena principale è costituita dal motivo ribosio (1''-> 2') ribosio-fosfato-fosfato (Fig. 6)

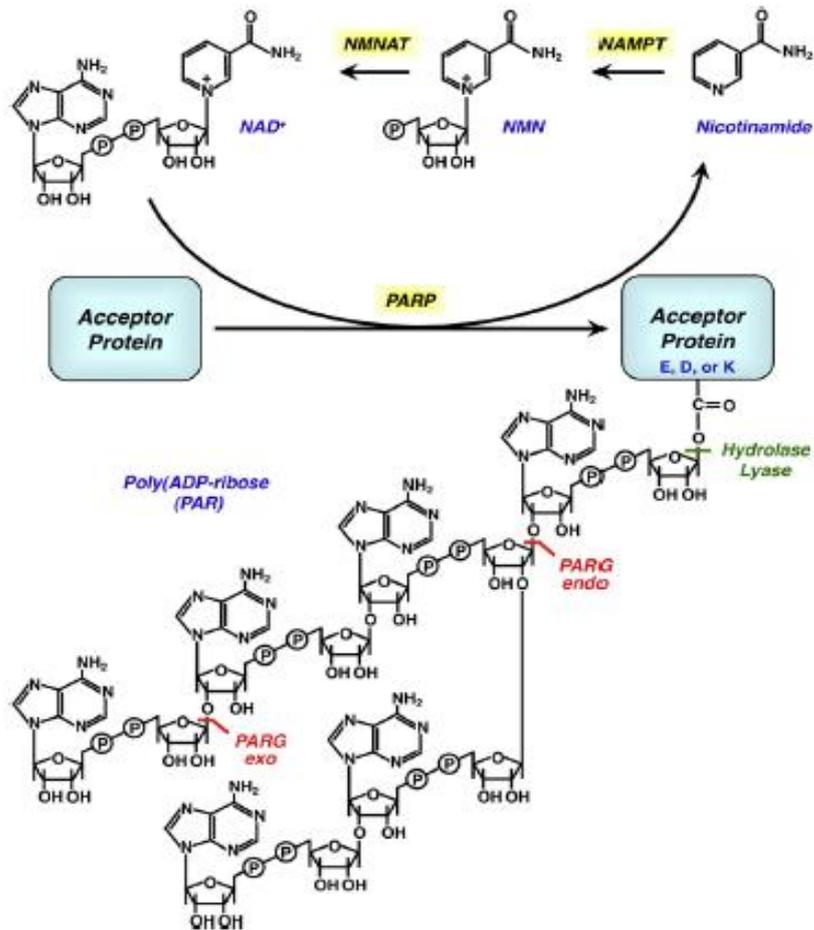


Fig. 6 Attività catalitica della PARP: la nicotinamide che si libera dalla reazione può essere riciclata nella via di salvataggio per risintetizzare NAD attraverso la NamPRT

In condizioni fisiologiche, in cui le cellule non presentano danni al DNA, la PARP-1 ha un'attività enzimatica molto bassa e risiede per lo più nel nucleoplasma. Quando agenti genotossici provocano una frammentazione della doppia elica del DNA, la proteina si lega ai punti di rottura ed incrementa di circa 500 volte la sua attività enzimatica (Krupitza and Cerutti, 1989). Il poli (ADP-ribosio) (PAR) è un polimero polianionico che può arrivare a superare in peso i 100 KDa ed in estensione le 200 unità monometriche (Alvarez-Gonzalez and Jacobson, 1987; Hayaishi and Ueda, 1977), la cui sintesi ha come target molteplici bersagli biologici, con conseguenze rilevanti sulla regolazione di numerosi aspetti della vita cellulare. Il PAR svolge la funzione di messaggero intracellulare perché,

quando legato alle proteine istoniche, è in grado di rilassare la cromatina e favorire il processo di riparazione del DNA. Infatti, grazie a fenomeni di repulsione elettrostatica dovuti alla presenza dei numerosi gruppi fosfato carichi negativamente, l'ADP-ribosilazione porta ad uno svolgimento del DNA dagli istoni e all'esposizione del sito danneggiato agli enzimi di riparazione. Il legame tra la PARP-1 e la doppia elica del DNA ha anche un'altra funzione importante, che consiste nell'arrestare momentaneamente l'attività della DNA-polimerasi nel punto in cui si è verificata la rottura del DNA. Questo ritardo nell'avanzamento della forza replicativa può fornire alla cellula il tempo necessario per riparare il danno, prima che avvenga la duplicazione del DNA. Numerose osservazioni confermano questa interazione tra la PARP-1 ed alcuni componenti del sistema replicativo quali la topoisomerasi I e la DNA-polimerasi α (Simbulan-Rosenthal et al., 1996) dimostrando che in condizioni di alterazioni genetiche questo enzima gioca un ruolo importante nel controllo della replicazione del DNA (**Fig. 7**).

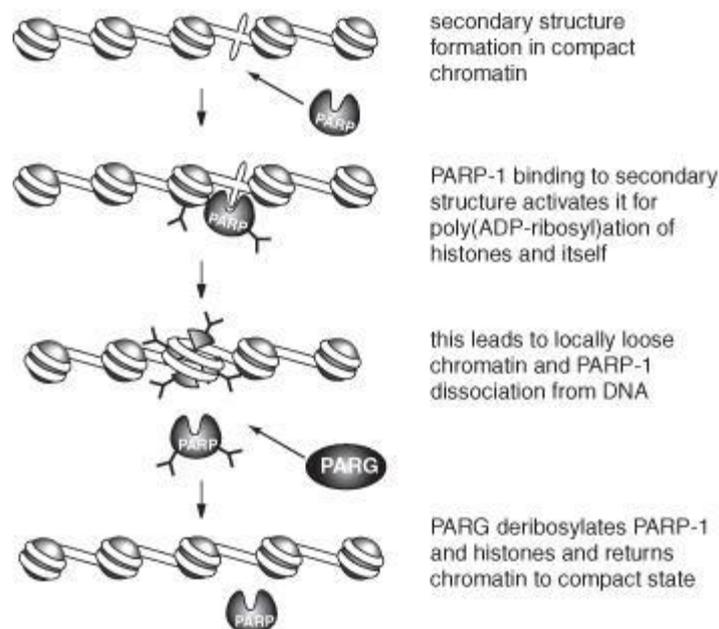


Fig. 7 La PARP-1 come sensore molecolare del danno al DNA

Se, dunque, in condizioni di blando danno al DNA, la PARP-1 appare come fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi genomica cellulare, quando la rottura del DNA risulta essere massiva, la PARP-1 passa da un livello di normale attivazione ad uno stato di iperattivazione, dando inizio ad un processo che concorrerà in ultima analisi alla morte cellulare. All'aumento dell'attività della PARP-1 corrisponde infatti una riduzione della concentrazione di NAD intracellulare, suo substrato. La forte variazione di questo nucleotide è in grado di regolare una grande quantità di processi cellulari come la glicolisi e il ciclo degli acidi tricarbossilici, e dunque la produzione di ATP; il NAD è inoltre il precursore del nicotinamide adenin dinucleotide fosfato (NADP), che agisce da cofattore nella via dei pentoso fosfati ed in molte reazioni di ossidoriduzione, ed è coinvolto nel mantenimento delle riserve di glutatione ridotto. Inoltre, la deplezione di NAD attiva il processo di resintesi del nucleotide, la via di salvataggio, con un consumo totale di un ATP per ogni molecola di NAD re- sintetizzata. Per cui una significativa riduzione delle concentrazioni intracellulari di NAD ha come prima conseguenza una riduzione del metabolismo energetico (Sims et al., 1983). Trattando cellule con alte concentrazioni di agenti genotossici, si arriva al blocco dei processi che necessitano energia (inclusa la sintesi di DNA, RNA ed altre proteine) e, dunque, dopo un iniziale picco di attività, anche del sistema di riparazione del DNA. In condizioni normali il NAD è sottoposto ad un processo omeostatico di metabolismo e rigenerazione continuo, mentre un'eccessiva attivazione della PARP provoca l'alterazione di questo equilibrio spostandolo verso il catabolismo del NAD, con conseguente riduzione del coenzima disponibile. Tutto ciò porta alla deplezione delle riserve energetiche cellulari, aggravando situazioni patologiche in cui l'omeostasi della cellula è già compromessa (Cipriani et al., 2005). Il trattamento con inibitori della PARP blocca la deplezione di NAD e ATP e preserva i processi dipendenti da tali fonti

di energia dall'esposizione ad agenti dannosi per il DNA (Cipriani et al., 2005). Sulla base di queste osservazioni Berger propose la cosiddetta "teoria del suicidio" (Berger, 1985), secondo la quale un grosso danno al DNA porterebbe a morte cellulare per deplezione di NAD e ATP. Questo suicidio cui va incontro la cellula è in realtà un meccanismo di salvezza, perché evita che una cellula estremamente danneggiata continui a vivere e replicarsi rischiando di andare incontro a mutazione e riduce, quindi, la potenzialità di una trasformazione maligna. Tutt'oggi restano tuttavia controversie sul ruolo che l'enzima gioca nel segnalare un danno al DNA e sulla modalità attraverso la quale il DNA danneggiato induca morte cellulare.

Attualmente, gli inibitori PARP sono valutati in trials clinici per il cancro e i disordini cardiovascolari. Sono farmaci ultrapotentissimi (IC50 1-3 nM) con un buon profilo di sicurezza e si sono rivelati efficaci in numerosi modelli sperimentali di neurodegenerazione.

MARTs

Un'ulteriore reazione enzimatica che necessita del NAD come substrato è catalizzata dalle *mono (ADP-ribosil) transferasi*, che trasferiscono un residuo di ADP-ribosio dal NAD su uno specifico amminoacido (solitamente arginina o cisteina) di proteine accettrici. Questo processo è distinto da quello catalizzato dalle PARPs, che trasferiscono polimeri ramificati di ADP-ribosio su proteine bersaglio (Corda and Di, 2003). Nelle cellule di mammifero, la reazione di mono-ADP-ribosilazione è regolata anche da enzimi in grado di revertire queste modificazioni post-traduzionali: le ADP-ribosil idrolasi citosoliche e le pirofosfatasi citosoliche ed extracellulari (Moss et al., 1992; Zolkiewska et al., 1994). Le prime

idrolizzano completamente il legame ADP-ribosio-proteina rilasciando l'ADP-ribosio, mentre le pirofosfatasi scindono il pirofosfato, rilasciando AMP e lasciando un ribosilfosfato ancorato alla proteina. La scoperta delle mono(ADP-ribosil) transferasi di mammifero è abbastanza recente. La prima è stata isolata nel coniglio negli anni '90 (Zolkiewska et al., 1992). Da allora sono state identificate 5 ART nell'uomo (ART1-5, anche se la 2 ha un codone di stop prematuro e probabilmente non è funzionale) e 6 nel topo (Corda and Di, 2003; Koch-Nolte et al., 1997). Queste ART di mammifero sono ectoenzimi ancorati al glicosilfosfatidilinositolo (GPI), che possiedono un sito attivo extracellulare (Corda and Di, 2003). Al contrario, uno di questi enzimi, ART5, manca della sequenza segnale per il legame al GPI in C terminale ed è secreta nello spazio extracellulare (Glowacki et al., 2002). La mono-ADP-ribosilazione negli eucarioti superiori modula la risposta immunitaria, l'adesione cellulare, varie cascate di segnalazione ed il metabolismo cellulare. La funzione dell'ADP-ribosilazione proteica da parte delle ecto-ART è stata studiata nel dettaglio e col tempo sta emergendo un quadro sempre più chiaro. ART1 è prevalentemente espressa nel muscolo scheletrico, nel cuore, nel polmone, nei neutrofili e nelle cellule T (Peterson et al., 1990; Zolkiewska et al., 1992). ART2 è stata descritta in cellule T mature di topo, ma nell'uomo sembra non essere tradotta a causa della presenza di codone di stop prematuro. Al momento non molto è noto sulla funzione di ART3, ART4 ed ART5 poiché non sono ancora state identificate le proteine target. ART3 ed ART5 sono caratterizzate da elevati livelli di espressione nei testicoli, mentre ART4 è espressa maggiormente nel tessuto linfatico (Grahner et al., 2002).

Sirtuine

Le *sirtuine* sono un'altra classe di proteine NAD-dipendenti che possiedono attività enzimatica come istone deacetilasi o mono-ribosiltransferasi. Nei mammiferi sono state identificate sette sirtuine, denominate SIRT1-7 e numerose proteine bersaglio, coinvolte nella regolazione della trascrizione, dell'apoptosi e del metabolismo (Imai and Guarente, 2010). In particolare, la deacetilazione istonica NAD-dipendente operata da SIRT1, la sirtuina nucleare più caratterizzata, gioca un ruolo critico nella regolazione di fondamentali risposte biologiche a stimoli nutrizionali ed ambientali in ogni compartimento cellulare (Blander and Guarente, 2004; Imai, 2009; Schwer et al., 2002). Nelle cellule eucariotiche, i cromosomi sono strutture altamente organizzate; il DNA è compattato in cromatina, superavvolto alle proteine istoniche. Gli istoni giocano importanti ruoli strutturali e funzionali in tutti i processi che avvengono nel nucleo (Mai et al, 2005; Fire et al, 1998). Le modificazioni istoniche, incluse l'acetilazione, la metilazione e la fosforilazione, svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione di processi come la trascrizione, il silenziamento genico e la memoria epigenetica (Strahal et al, 2000; Berger, 2002). Tra le varie modificazioni istoniche, l'acetilazione è il fenomeno meglio studiato (Kurdistani et al, 2003). Le lisine amino terminali delle proteine istoniche vanno incontro ad acetilazione-deacetilazione a seconda delle diverse condizioni fisiologiche (Kornberg et al, 1999). Il bilancio tra le modificazioni viene raggiunto attraverso l'azione degli enzimi istone acetiltransferasi (HATs) e istone deacetiltransferasi (HDACs). Questi enzimi catalizzano il trasferimento di un gruppo acetile da molecole di acetil-Coenzima A ai gruppi aminici di lisine delle code N terminali degli istoni (Yang et al, 2004). Poiché la lisina regola la trascrizione interagendo con l'eterocromatina ben impacchettata in modo da renderla eucromatina allo

stato rilassato, l'acetilazione, catalizzata dalle HATs, è associata ad attivazione della trascrizione genica. Al contrario la deacetilazione catalizzata dalle HDACs è associata al silenziamento genico. Le sirtuine sono HDAC di classe III e, a differenza di tutte le altre deacetilasi, possiedono un meccanismo deacetilasico NAD dipendente (Shahper et al, 2010). Alcune patologie possono essere associate a disfunzioni nei livelli di acetilazione delle proteine istoniche (iperacetilazione di regioni cromosomiche che sono normalmente silenziate o la deacetilazione di regioni cromosomiche che sono attivamente trascritte) come ad esempio casi di asma severa insensibile a steroidi (Bergeron et al, 2006), obesità (Lagace et al, 2004), malattie neurodegenerative (McC Campbell et al, 2001), e cancro (Jones et al, 1999). Oltre al ruolo che svolgono nella regolazione della trascrizione, le sirtuine possono avere anche bersagli non istonici (Porcu et al, 2005) come, ad esempio, l'oncosoppressore p53, i fattori di trascrizione FOXO che regolano il metabolismo, la progressione del ciclo cellulare e la tolleranza allo stress, la proteina Ku70 coinvolta nella riparazione del DNA e la subunità p65 di NF-kB, un fattore di trascrizione che gioca un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria. Poiché SIRT1 dipende dal NAD per la sua attività deacetilasica, lo stato metabolico della cellula può influenzarne l'attivazione. In cellule esposte a danno genotossico o ad uno shock, ad esempio, i livelli di NAD potrebbero ridursi notevolmente come conseguenza dell'attivazione PARP, influenzando notevolmente l'attività delle sirtuine (Zhang, 2003). Crescenti evidenze dimostrano che la biosintesi di NAD, mediata dall'enzima NamPT a partire dalla Nam, riveste un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività di SIRT1 in diversi tessuti. Questa osservazione ha destato l'interesse della comunità scientifica nello studio di possibili strategie per aumentare i livelli di NAD intracellulari, al fine di ottenere effetti benefici a livello metabolico, tramite l'attivazione di SIRT1.

CD38

Il NAD è, inoltre, mediatore di diverse vie di segnalazione implicate in varie condizioni fisiologiche, perchè substrato per la generazione di secondi messenger come l'ADP-ribosio ciclico (cADPR). L'enzima responsabile della formazione di cADPR dal NAD è la *NADasi* o *NAD glicoidrolasi* di cui esistono due omologhi nei mammiferi, CD38 e CD157 (Liu et al, 2005). La presenza di CD38 è pressoché ubiquitaria a livello del sistema immunitario (Malavasi et al, 2008); CD38 è espresso significativamente nei timociti umani, nei linfociti T e B in modo dipendente dal grado di attivazione (d'Arbonneau et al, 2006; Deaglio et al, 2001), nei monociti circolanti (Musso et al, 2001), nelle cellule natural killer (NK) (Mallone et al, 2001), nei granulociti (Fujita et al, 2005) e nei precursori di osteoclasti ed osteoblasti circolanti (Shalhoub et al, 2000). Per quanto riguarda i tessuti non immunitari, forme attive dell'enzima sono state trovate, ad esempio, sulla membrana esterna degli eritrociti (Zocchi et al, 1993), delle piastrine (Ramaschi et al, 1996), dei neuroni (Mizuguchi et al, 1995) e degli astrociti di ratto (Verderio et al, 2001). L'enzima è in grado di idrolizzare il NAD a Nam e ADPR e, inoltre di ciclizzare la molecola di ADPR, trasformandola in cADPR. L'attività ribosil ciclasica è stata trovata in diverse specie, dagli organismi unicellulari agli invertebrati, alle piante, ai mammiferi, suggerendo che il metabolismo del cADPR sia stato preservato nell'evoluzione come un secondo messaggero ubiquitario (Higashida et al, 1999; Okamoto, 1999). In realtà CD38 è molto inefficiente nel produrre questo secondo messaggero, poiché sono necessarie quasi 100 molecole di NAD per generare una molecola di cADPR (Kim et al, 1993; Zielinska et al, 2004). In base a ciò, CD38 è stato valutato, più che come un enzima in grado di generare il secondo messaggero, come una *NADasi* che controlla i livelli intracellulari di NAD (Aksoy et al, 2005). Questo

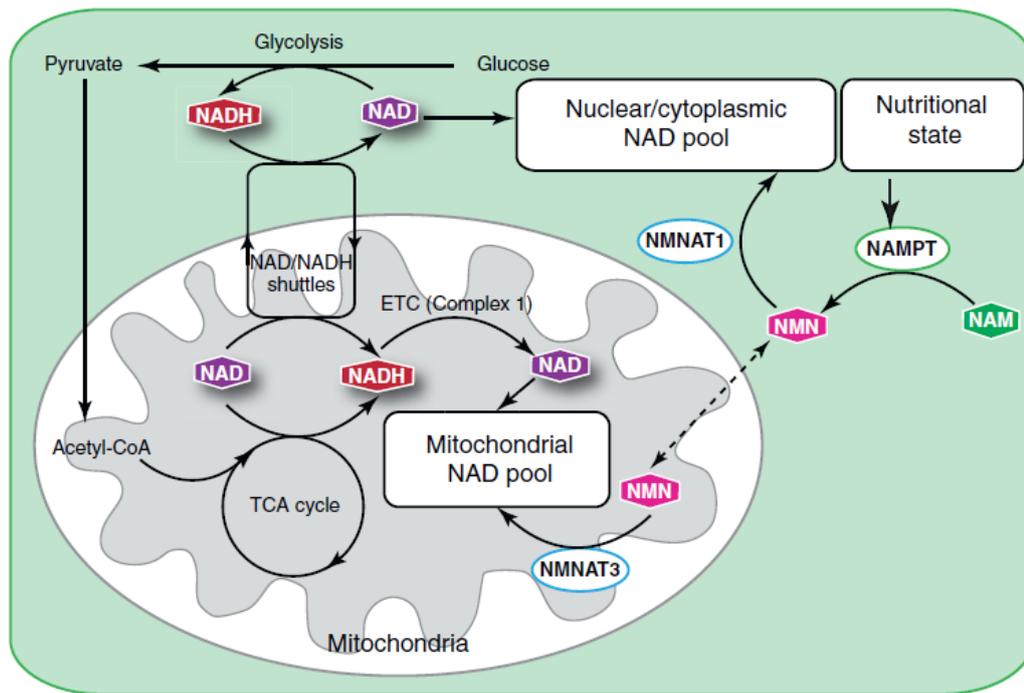
concetto è confermato dal fatto che topi knockout per il gene codificante CD38 hanno livelli basali di NAD 10-20 volte maggiori rispetto a topi wild-type. In realtà, CD38 è un ectoenzima e possiede il sito catalitico sulla superficie extracellulare della membrana citoplasmatica (Aksoy et al, 2005), perciò la questione di come sia in grado di regolare i livelli di NAD intracellulari, piuttosto che extracellulari, e di come possa generare cADPR nel citoplasma, dove sarebbe disponibile per interagire con i canali del calcio, rimane molto controversa. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare queste osservazioni, inclusa la traslocazione di cADPR promossa da CD38 e l'internalizzazione di CD38 stesso, ma senza giungere ad una conclusione (Guse, 2000). CD38 può anche catalizzare una reazione di transglicosilazione (che consiste nella deamidazione della Nam del NADP) che porta alla sintesi di un altro secondo messaggero il NAADP. Questa reazione enzimatica avviene solo a pH acido, suggerendo che NAADP serva come secondo messaggero in particolari condizioni di alterazione dell'equilibrio acido-base (Lee, 2004). L'enzima CD38, generando i secondi messaggeri cADPR e NAADP dal NAD e dal NADP rispettivamente, modula il rilascio di calcio dai compartimenti intracellulari (Lee, 2001). Mentre il cADPR, come il noto inositol (1,4,5)-trifosfato, rilascia calcio con un meccanismo calcio-indotto (CICR), l'effetto del NAADP è indipendente dalla concentrazione di calcio citosolica (Chini et al, 1996). Il cADPR attiva, inoltre, il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico (o sarcoplasmatico) con il coinvolgimento di recettori rianodinici, mentre il NAADP libera il calcio dai lisosomi tramite un recettore di membrana non ben identificato (Patel et al, 2001; Galione et al, 2000). Eventi cellulari importanti correlati alla mobilitazione di calcio indotta da cADPR e NAADP includono la contrazione muscolare, i flussi ionici, la secrezione di catecolamine, la secrezione di insulina e l'attivazione di cellule T (Lee, 2001; Patel et al, 2001).

La regolazione del NAD nei mitocondri

i mitocondri hanno bisogno del NAD come cofattore essenziale per la produzione di ATP e per il mantenimento del potenziale di membrana. Poiché il ciclo degli acidi tricarbossilici e la fosforilazione ossidativa necessitano di NAD e NADH rispettivamente, è indispensabile mantenere un rapporto NAD/NADH ottimale all'interno dell'organello per un metabolismo mitocondriale efficiente.

Studi recenti hanno dimostrato che i livelli di NAD intracellulari sono limitanti per il corretto funzionamento mitocondriale (Alano et al., 2004; Bai et al., 2011b; Pittelli et al., 2011). Inoltre, la biosintesi, la localizzazione subcellulare e il trasporto del NAD e dei suoi intermediari giocano un ruolo importante nella regolazione di vari processi biologici, in particolare coinvolti nel corretto funzionamento mitocondriale (Alano et al., 2004; Sauve, 2008; Stein and Imai, 2012)

Il pool di NAD mitocondriale sembra essere distinto dal quello citoplasmatico (Pittelli et al., 2010; Yang et al., 2007a). Mentre il rapporto NAD/NADH nel citoplasma di una tipica cellula eucariotica è nell'intervallo tra 60 e 700, nei mitocondri è mantenuto tra 7 e 8 (Williamson et al., 1967). I livelli di NAD mitocondriale possono essere più elevati di quelli citoplasmatici, ma la differenza nei contenuti intra-compartimentali del nucleotide dipendono dal tipo cellulare considerato (Sauve, 2008). Ad esempio, nei miociti cardiaci il NAD mitocondriale rappresenta il 70% del pool cellulare, (Alano et al., 2007; Di Lisa et al., 2001), il 50% nei neuroni (Alano et al., 2007), il 30-40% negli epatociti (Sauve, 2008) e negli astrociti (Alano et al., 2007).



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Fig.8 Omeostasi del NAD mitocondriale

Queste differenze rispecchiano, presumibilmente, le necessità metaboliche della cellula (Di Lisa et al., 2001). Crescenti evidenze dimostrano che il NAD mitocondriale può essere preservato almeno per 24 h anche in seguito ad una deplezione massiva del NAD citoplasmatico (Alano et al., 2007; Alano et al., 2010; Di Lisa et al., 2001; Houtkooper and Auwerx, 2012; Pittelli et al., 2010; Yang et al., 2007a). Questo pool di NAD potrebbe essere sequestrato nei mitocondri per mantenere i livelli di ATP e, quindi, la sopravvivenza cellulare fino alla rottura della membrana mitocondriale. Alcuni studi suggeriscono che i mitocondri possiedano un meccanismo autonomo per la biosintesi del NAD in grado di mantenere il pool di NAD mitocondriale in seguito a stress ambientali o nutrizionali (Yang et al., 2007a). Ciò nonostante, non è stato ancora chiarito se il NAD mitocondriale sia realmente originato all'interno dell'organello o sia di origine citoplasmatica, ed è attualmente argomento di intenso dibattito. Infatti, dal momento che la permeabilità della membrana interna mitocondriale è altamente

regolata, l'esistenza (o l'assenza) di una via biosintetica all'interno dell'organello ha fatto sorgere la questione di come i precursori del NAD (o il NAD stesso) possano entrare nella matrice mitocondriale. Nel lievito, il NAD non viene sintetizzato nei mitocondri (Todisco et al., 2006), ma viene trasportato dalle nucleosidi deossiribosiltrasferasi Ndt1 e Ndt2 mediante antiporto con AMP e GMP mitocondriali (Todisco et al., 2006). Un trasportatore mitocondriale del NAD, denominato AtNDT2, è stato identificato anche in *Arabidopsis* (Palmieri et al., 2009). Al contrario, nelle cellule di mammifero, non è stato ancora identificato un trasportatore mitocondriale per il NAD (Todisco et al., 2006; Yang et al., 2007a) e il NAD non è in grado di attraversare la membrana interna mitocondriale di organelli isolati (Barile et al., 1996), ma questo non è sufficiente per escludere la possibilità di un eventuale scambio del nucleotide tra citoplasma e mitocondri. Come mostrato in **Fig. 8** l'enzima NMNAT3 sembra essere localizzato nei mitocondri (Berger et al., 2005; Nikiforov et al., 2011), ma numerosi studi hanno riportato la presenza della NamPT esclusivamente nel citoplasma (Nikiforov et al., 2011; Pittelli et al., 2010; Revollo et al., 2004; Sasaki et al., 2006). Questo presupporrebbe l'esistenza di un trasportatore per l'NMN, prodotto dalla NamPT nel citoplasma, sulla membrana interna mitocondriale, che però non è stato ancora identificato. Le informazioni attuali sulla biosintesi del NAD nei mitocondri lasciano ancora aperti numerosi interrogativi e sono necessari ulteriori studi per identificare la vera origine del NAD mitocondriale e per poter sviluppare strategie efficaci al fine di preservare la funzionalità mitocondriale.

SCOPO DELLA RICERCA

Le malattie mitocondriali sono un gruppo di devastanti patologie per le quali non esistono ancora trattamenti efficaci. Tuttavia, è necessario conoscere i meccanismi patogenetici indotti dal difetto genetico primario per identificare una strategia farmaco-terapeutica e per capire se la disfunzione mitocondriale possa essere in parte attenuata stimolando vie metaboliche alternative.

Alcune evidenze suggeriscono che la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sia la causa principale della morte cellulare in queste patologie (Fato et al., 2008). L'iperattivazione dell'enzima PARP1, che utilizza il NAD come substrato, è un evento chiave nella morte cellulare ROS dipendente. Infatti, un'eccessiva attività di PARP-1 depleta i contenuti di NAD e ATP intracellulari, portando a squilibrio energetico e morte cellulare (Chiarugi, 2002). Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che due enzimi della famiglia PARP, PARP-1 e PARP-2, regolano negativamente la bioenergetica cellulare limitando l'attività di SIRT1, riducendo la disponibilità di NAD e downregolando la sua espressione rispettivamente (Bai et al., 2011a; Bai et al., 2011b).

I nucleotidi piridinici NAD(H) e NADP(H) giocano un ruolo fondamentale nel funzionamento mitocondriale. E' sorprendente come, ciò nonostante, l'origine metabolica del NAD mitocondriale sia ancora completamente sconosciuta. Recenti teorie sostengono che il NAD sia formato all'interno dell'organello (Nikiforov et al., 2011; Stein and Imai, 2012) ma ancora non esistono chiare evidenze biochimiche che questo avvenga. Inoltre, non è noto se difetti genetici primari di geni codificanti proteine mitocondriali possano alterare l'omeostasi del NAD all'interno dell'organello, evento che di conseguenza potrebbe contribuire al peggioramento dello squilibrio energetico. Studi recenti dimostrano che l'aumento del NAD intracellulare è in grado di migliorare la funzionalità

mitocondriale (Bai et al., 2011b;Pittelli et al., 2011) e potrebbe essere di rilevanza terapeutica per pazienti che soffrono di disordini metabolici, incluse le malattie mitocondriali.

Alla luce di queste osservazioni, lo scopo della tesi è stato quello di ottenere nuove informazioni sul metabolismo del NAD mitocondriale, di valutare il possibile ruolo patogenetico di enzimi -le PARPs- che utilizzano il NAD come substrato e di valutare l'effetto farmacologico dell'inibizione PARP in un modello murino di malattia mitocondriale.

La ricerca è stata suddivisa in due parti fondamentali:

La prima parte è stata incentrata sullo studio dell'origine metabolica del NAD mitocondriale. In particolare, abbiamo valutato il contributo dell'NMNAT3, unico enzima della via biosintetica del NAD al momento individuato nell'organello, al mantenimento del pool di NAD mitocondriale.

Fino a questo momento, l'enzima NMNAT3 è stato studiato esclusivamente mediante l'utilizzo di vettori plasmidici in grado di indurre artificialmente l'espressione e non è stata mai valutata la rilevanza funzionale della proteina endogena nell'omeostasi del NAD mitocondriale. La nostra ricerca ha avuto come scopo quello di valutare l'espressione costitutivi dell'enzima, a livello di RNA messaggero e come proteina, in differenti condizioni sperimentali; di studiare l'effetto del silenziamento transiente e stabile dei livelli endogeni di NMNAT3 nella linea cellulare HEK293 sull'attività enzimatica NMNAT e sui livelli di NAD intracellulari e mitocondriali. Come controllo, è stato valutato anche l'effetto del silenziamento di NMNAT1 sugli stessi parametri nei differenti compartimenti cellulari. Sono stati analizzati anche i contenuti di ATP e il consumo di ossigeno come indice del contributo bioenergetico dell'enzima.

Abbiamo inoltre trasfettato in cellule HEK293 le diverse varianti dell'NMNAT3, da noi identificate per la prima volta, per studiarne la localizzazione, l'attività e l'effetto funzionale. Inoltre, abbiamo analizzato l'effetto del NAD esogeno e dei suoi precursori aggiunti al medium di coltura delle cellule HEK293 sui livelli di NAD mitocondriali, in diverse condizioni sperimentali, utilizzando una nuova metodica per l'analisi indiretta del pool di NAD nell'organello.

Lo scopo della seconda parte della ricerca è stato quello di valutare la possibile alterazione dei contenuti di NAD e l'attivazione PARP in un modello murino di malattia mitocondriale e di analizzare l'effetto della soppressione genica o farmacologica di PARP sull'esordio e la progressione della patologia.

Per questo scopo abbiamo utilizzato, come modello animale, i topi NDUFS4 knockout gentilmente fornitici dal gruppo del prof. Palmiter dell'Howard Hughes Medical Institute di Washington. In questi topi abbiamo misurato i livelli di NAD cerebrali e la quantità di poli(ADP)ribosio come indice di attivazione PARP, sia all'esordio che ad uno stadio avanzato della malattia per stabilire un'eventuale correlazione tra livelli di NAD (e/o attivazione PARP) e la severità della malattia. Ancora, i topi sono stati sottoposti al trattamento cronico con un potente inibitore PARP sviluppato da Astrazeneca e sono stati valutati gli effetti sul peso e su diversi parametri neurologici caratteristici della malattia mitocondriale. Infine, incrociando i topi Ndufs4 KO con topi deficienti per PARP-1 abbiamo generato per la prima volta topi KO per entrambi i geni PARP-1 e NDUFS4. In questo modo, abbiamo potuto valutare l'effetto selettivo della soppressione genica di PARP-1 sull'esordio della malattia, sui sintomi e sulla sopravvivenza dei topi trattati rispetto a topi esposti al solo veicolo.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Le linee cellulari utilizzate nello studio sono state mantenute in coltura in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) integrato con 2mM di glutamina, 10% di siero fetale bovino e antibiotici. Il giorno prima dell'esperimento le cellule sono state piastrate ad una confluenza del 50-70% e successivamente esposte al trattamento voluto. Le cellule sono state esposte a NAD, NAM, NMN, nicotinamide riboside e acido nicotinico o ad altri composti, direttamente disciolti nel terreno di coltura. NR è stata sintetizzata come descritto da Yang et al. (Yang et al., 2007b).

Shock termico

Per gli esperimenti di shock termico, cellule HEK293, piastrate il giorno precedente al 50-70% di confluenza, sono state incubate per 30 minuti in un bagnetto riscaldato a 44°C e poi soggette a differenti periodi di recupero a 37°C (da 1h a 3h). In seguito, è stato estratto e retro-trascritto l'RNA totale come descritto nei paragrafi seguenti e sono stati valutati i livelli di espressione delle NMNAT1-3.

Misurazione della concentrazione di NAD

I contenuti di NAD intracellulari sono stati quantificati mediante l'uso di una reazione enzimatica ciclica descritta in Cipriani et al. (Cipriani et al., 2005). Questo saggio colorimetrico prevede l'ossidazione della miscela MTT - Fenazina etosolfato da parte dell'Alcol deidrogenasi, che utilizza il NAD come cofattore, con conseguente colorazione verde-bluastro che si forma in maniera

proporzionale ai contenuti di NAD presenti nell'estratto cellulare. La valutazione dell'intensità di colore viene dunque valutata con uno spettrofotometro Victor3 (PerkinElmer) alla lunghezza d'onda di 600 nm. Per calcolare i contenuti di NAD di ciascun campione è stata utilizzata una curva standard ottenuta con soluzioni di NAD a diverse concentrazioni (da 1µM a 10mM).

Separazione dei compartimenti cellulari

I mitocondri e i nuclei sono stati isolati da cellule HEK293 usando un omogenizzatore vetro-vetro (80 colpi) in 500 µl di tampone di isolamento (TRIS/MOPS 10mM, EGTA/TRIS 1mM, saccarosio 200mM, pH 7.4) come descritto in Formentini et al (Formentini et al., 2009). Brevemente, i surnatanti sono stati prima centrifugati 600 g per ottenere la frazione nucleare e poi sono stati centrifugati a 7000 g per ottenere il pellet mitocondriale.

Saggio enzimatico per l'attività NMN-adenililtrasferasica

Per il saggio enzimatico, le cellule, i nuclei o i mitocondri sono stati lisati in 200 µl di buffer di lisi (25 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,5% Triton-X). Gli estratti sono stati incubati per 30 minuti a 37°C in un buffer di reazione contenente 50 mM Tris/HCl pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ insieme a 1 mM NMN e/o 1 mM ATP. La formazione di NAD è stata valutata utilizzando il metodo enzimatico ciclico descritto in precedenza.

Western blotting

Per il western blotting, le cellule da pozzetti a confluenza (24 o 48 multiwell) sono state lisate in un tampone di lisi (50mmol/L Tris, pH 7,4, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF, 4µg/ml aprotinina e leupeptina, 1% SDS). Sono state dosate le proteine e caricate su gel di elettroforesi (4-20% SDS-PAGE). Le proteine separate sul gel sono state poi trasferite su membrana (Hybond-ECL, Amersham,UK) bloccate in TBS contenente 0.1% Tween-20 e 5% di latte per 1 ora e incubate overnight con l'anticorpo primario (1:1000 in TBST/5% latte). Il giorno dopo le membrane sono state lavate in TPBS e successivamente incubate con anticorpo secondario corrispondente coniugato alla perossidasi diluito 1:2000 in TPBS/5% latte. Le bande delle proteine legate alla perossidasi sono poi visualizzate mediante incubazione con ECL-Plus (Amersham, UK). L'anticorpo anti-PAR (10H) e l'anticorpo monoclonale anti-ubiquitina utilizzati sono stati acquistati dall'Alexis (Vinci, Italia). L'anticorpo policlonale anti-NMNAT3 è stato gentilmente fornito dal gruppo del prof. Magni (Università Politecnica delle Marche).

PCR, clonaggi e trasfezioni

L'RNA totale è stato estratto da cellule HEK293 o da tessuti umani tramite l'utilizzo dell' RNeasy mini kit (Qiagen, Milano). Gli acidi nucleici sono stati poi sottoposti ad un processo di digestione con la RNasi-free DNasi e l'RNA risultante è stato quantificato. Un µg di RNA è stato retrotrascritto utilizzando la iScript (Bio-Rad Milan Italy) e amplificato con specifici primers descritti in [Tabella](#). I prodotti di PCR sono stati separati su gel di agarosio al 2% e le relative bande sono state analizzate tramite Sanger sequencing.

Le PCR Real-Time sono state effettuate, usando lo strumento Rotor-Gene 3000 (Qiagen) e il kit per PCR Rotor-Gene™ SYBR® Green (Qiagen, Milano). Sono stati utilizzati i seguenti primers: per NMNAT1 forward 5'-TCCCATCACCAACATGCACC-3' e reverse 5'-TGATGACCCGGTGATAGGCAG-3'; per NMNAT3v1/FKSG76 forward 5'-ATGGGAAGAAAGACCTCGCAG-3' and 5'-AGTTTGCTGTGATGATGCCTC-3'; per 18S, forward 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' e reverse 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'. I primers sono stati acquistati alla IDT (Leuven, Belgio). I primers utilizzati per il clonaggio sono per NMNAT3v1: forward 5'-GGTACCGTTATGGGCTACCAGGTCATCCAGGGT-3' e reverse 5'-GAACTCGAGCTAGCTTGTCTTGCCCTCAGTGC-3'. Il prodotto di amplificazione ottenuto da cDNA di HEK293 è stato clonato nel vettore pCDNA3.1+ (Invitrogen, Milano, Italia) contenente la sequenza FLAG.

Le cellule HEK 293 sono state trasfettate con 4 µg dei differenti plasmidi pCDNA3-NMNAT3v1-FLAG, pFLAG5-FKSG76 (Berger et al., 2005), mitoPARP1-cd (Dolle et al., 2010) o con il vettore vuoto. Il silenziamento è stato ottenuto adottando un protocollo di silenziamento a “doppio colpo”, esponendo le cellule a 50 nM di siRNA (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) contro NMNAT1 or NMNAT3 al tempo zero e dopo 48 ore. Per la trasfezione ed il silenziamento è stato usato il kit jetPRIME™ (Polyplus, Illkirch, France).

Valutazione dell'effetto funzionale dell'upstream ORF

Per amplificare la sequenza del 5'UTR contenente la upstream ORF (uORF) sono stati usati i seguenti primers: forward
AGAAGCTTTGCCATGAAGCGGACTGCTGCTC e reverse
AACCATGGTATCAGGCACATCCACCC per FKSG76, o forward
AGAAGCTTTGCCATGAAGCGGACTGCTGCTC e reverse
AACCATGGTCCTTATTAATTGGGAGACAAG per NMNAT3v1. Per mutagenizzare le ATG delle uORF uORF abbiamo amplificato con il primer forward AGAAGCTTTGCCGGAAGCGGACTGCTGC contenente GGG al posto del codone di start ATG. I frammenti di PCR sono stati clonati nei siti HindIII e NcoI del vettore per la luciferasi (luciferase-expressing pGL3-Promoter Vector) (Promega, Madison, WI) per ottenere i seguenti plasmidi: pGL3-FKSG76-uORF, pGL3-FKSG76-Mut-uORF, pGL3-NMNAT3v1-uORF or pGL3-NMNAT3v1-Mut-uORF. Le cellule HEK293 sono state quindi co-trasfettate con il plasmide pGL4,71 esprime la luciferasi renilla come standard interno. Il saggio per la luciferasi è stato poi effettuato come descritto in Lapucci et al. (Lapucci et al., 2011).

Immunocitochimica

Le cellule sono state fatte crescere su vetrino e trasfettate con i vari plasmidi. Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lavate con PBS e fissate in etanolo freddo. Dopo un'ora di permeabilizzazione e bloccaggio con PBS/0,3% Triton X contenente 20 mg/ml di BSA, le cellule sono state incubate per 2 ore con PBS contenente 5 mg/ml BSA e l'anticorpo primario diluito 1:200. L'anticorpo

monoclonale anti-FLAG è stato acquistato alla Sigma (Milano, Italia) e l'anticorpo monoclonale anti-PAR (10H) dalla Alexis (Vinci, Italia). Dopo diversi lavaggi, le cellule sono state incubate con il corrispondente anticorpo secondario (1:200 in PBS contenente 5 mg/ml BSA) e di nuovo lavate con PBS e montate su un vetrino porta-oggetto. Le immagini sono state acquisite usando un microscopio a fluorescenza Nikon TE2000-U collegato ad una fotocamera Photometrics CF mono CCD, tramite il software Metamorph imaging.

Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale

Le variazioni del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) sono state monitorate mediante citofluorimetria (Cipriani et al., 2005). Le cellule, trasfettate con il vettore vuoto o con il plasmide per FKSG76, sono state incubate con il marker mitocondriale fluorescente tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) 2,5 nM per 30 minuti, staccate e analizzate. Brevemente, le cellule sono lavate con PBS, incubate con tripsina (50 μ l/0.25%/2 min) e poi diluite con 350 μ l di DMEM completo. 200 μ l della sospensione di cellule sono stati ulteriormente diluiti con 400 μ l di PBS e analizzati con il citofluorimetro Coulter EPICS XL (Beckman Coulter, Inc) equipaggiato con il software EXPO32 Flow Cytometry ADC (Beckman Coulter, Inc).

Analisi strutturale dei prodotti del gene nmnat3

L'analisi strutturale è stata disegnata con Swiss PDB Viewer (DeepView) Le strutture sono state inoltre analizzate utilizzando i server Robetta and Phyre.

Valutazione dei contenuti di NAD mitocondriali con il mitoPARP-1cd

Il contenuto di NAD nei mitocondri è stato valutato usando il costrutto mitoPARP-1cd come descritto in (Dolle et al., 2010). Brevemente, le cellule sono state trasfettate con un dominio catalitico della PARP-1 mitocondriale (mitoPARP-1cd) e/o con FKSG76. Dopo 48 ore, è stata valutata la formazione di PAR tramite Western blot. Le variazioni nella quantità di PAR immuno-localizzato riflettono i cambiamenti del contenuto di NAD nei mitocondri. Il trattamento con NAD o precursori è stato effettuato 48 ore prima dell'analisi del polimero.

Immunoprecipitazione

Mitocondri isolati da cellule HEK293 e cellule trasfettate con il plasmide codificante FKSG76 sono stati lisati in 200 μ L di buffer di lisi contenente 25 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,5% Triton-X. Gli estratti ottenuti sono stati poi incubati overnight a 4 °C con 8 μ g di anticorpo primario monoclonale di ratto diretto contro FKSG76. In seguito, sono stati aggiunti all'estratto 20 μ L di Protein G PLUS-Agarose beads per precipitare il complesso proteina-anticorpo e la soluzione è stata lasciata in incubazione per 2h a 4°C. Infine, l'immunoprecipitato e il surnatante sono stati separati per centrifugazione 5 min a 4°C a 1000 g ed analizzati in Western Blot come descritto in precedenza utilizzando l'anticorpo policlonale anti-NMNAT3 di coniglio per l'immuno-localizzazione.

Trattamento animali

Le procedure che riguardano gli animali e la loro cura sono state condotte in accordo alle linee guida (DL 116/92), con l'applicazione della Direttiva del

Consiglio della Comunità Europea (86/609/EEC) e formalmente approvate dal Comitato etico per la sperimentazione sugli animali del Dipartimento di Farmacologia dell'Università di Firenze.

I topi *Ndufs4* KO, genotipizzati intorno a p20, sono stati trattati cronicamente una volta al giorno, a partire da p30 per tutta la durata della vita (\approx p60). Il trattamento è stato effettuato con il PARP inibitore KU-0058948 sviluppato da Astrazeneca (Inghilterra, Londra) sciolto in PBS 5 mg/Kg, mediante iniezioni intraperitoneali.

Genotipizzazione e generazione della colonia di topi doppi knockout per *Ndufs4* e *PARP-1*

Topi eterozigoti per *Ndufs4* mutato, fornitici dal gruppo del prof. Palmiter dell'Howard Hughes Medical Institute di Washington, sono stati mantenuti in accoppiamento per l'ottenimento dei topi *Ndufs4* knockout utilizzati per gli esperimenti. Le nidiate sono state genotipizzate tra il p20 e il p25. Brevemente, le punte delle code dei topi sono state rimosse e digerite in proteinasi K, per procedere con l'estrazione del DNA genomico. Tramite RT-PCR, è stato amplificato sul DNA estratto il gene *Ndufs4* utilizzando i seguenti primers: *Ndufs4* Forward: 5' AGC CTG TTC TCA TAC CTC GG *Ndufs4* Reverse: 5' GGT GCA TAC TTA TAC TAC TAG TAG. Il genotipo è stato distinto sulla base dei prodotti di amplificazione ottenuti (WT: una banda a 1 Kb; KO: una banda 260 bp; eterozigote entrambe le bande).

Per ottenere topi doppi knockout per *Ndufs4* e *PARP-1*, i topi eterozigoti per *Ndufs4* sono stati accoppiati con i topi *PARP-1* KO fornitici dal prof. Wang del Leibniz Institute for Age Research di Jena, Germania. Dopo aver ottenuti topi doppi eterozigoti, quest'ultimi sono stati accoppiati per ottenere una colonia

stabile di topi PARP-1 KO eterozigoti per Ndufs4. Le nidiate di questi topi erano caratterizzate per il 25% da topi doppi KO per PARP-1 e Ndufs4, genotipizzati come descritto in precedenza.

Valutazione della progressione della malattia nei topi Ndufs4 KO

Topi Ndufs4 KO trattati con il veicolo o con l'inibitore PARP sono stati valutati sulla base di segni neurologici caratteristici. In particolare, è stato assegnato un punteggio da 0 a 5 ai seguenti parametri: 1) comportamento atassico 2) tendenza a non allineare le zampe posteriori al corpo 3) equilibrio sulla griglia e 4) forza delle zampe anteriori. E' stato inoltre valutato l'effetto del trattamento sul peso e sulla sopravvivenza degli animali.

Analisi statistica

La significatività statistica di tutti gli esperimenti è stata valutata tramite il test del t student o l'analisi della varianza (test di Turkey).

RISULTATI

PARTE I: Studio dell'origine metabolica del NAD mitocondriale

Identificazione delle varianti di NMNAT3 espresse nelle cellule umane

Cercando di comprendere la struttura del gene codificante l'NMNAT3, ci siamo scontrati con una serie di inconsistenze presenti in GenBank. Secondo quanto descritto nel lavoro di Zhang et al, l'NMNAT3 è codificata dal trascritto denominato FKSG76, che origina dal gene *fksg76* localizzato sul cromosoma 8 (accession AF345564) (Zhang et al., 2003). Al contrario, cercando sull'NCBI, si identifica un gene denominato *nmnat3* localizzato sul cromosoma 3 che codifica due differenti trascritti chiamati NMNAT3v1 (accession NM_178177.3) e NMNAT3v2 (accession NM_001200047.1).

Abbiamo quindi cercato conferma della presenza del gene *fksg76* sul cromosoma 8, effettuando un'analisi comparativa tra le sequenze dei messaggeri e il DNA genomico, ma abbiamo identificato una corrispondenza univoca tra tutti i trascritti e un unico gene presente sul cromosoma 3. Confrontando poi le strutture dei tre trascritti FKSG76, NMNAT3v1 and NMNAT3v2 abbiamo identificato una sostanziale omologia di sequenza (**Fig. 9**).

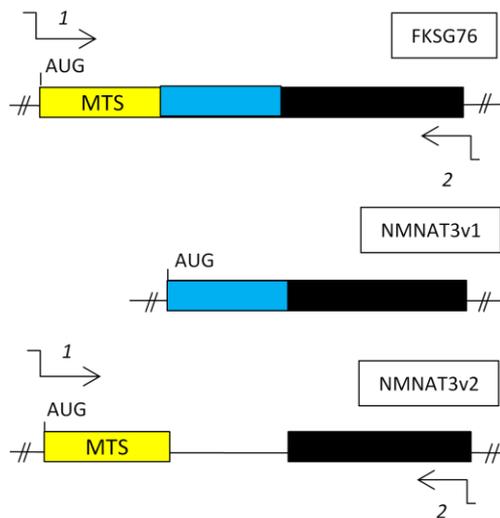


Fig 9. Rappresentazione schematica delle strutture delle ORF di FKSG76, NMNAT3v1 e NMNAT3v2. I colori rappresentano le regioni di omologia. Sono rappresentate le posizioni di annealing dei primers 1 e 2 usati per amplificare le ORF di FKSG76 e NMNAT3v1

Come si può notare dallo schema in **Fig. 9**, la sequenza di target mitocondriale (MTS) presente nei trascritti FKSG76 e NMNAT3v2 non si trova nella variante NMNAT3v1, suggerendo una possibile localizzazione intracellulare differente della proteina codificata da questo mRNA.

Per ottenere inoltre informazioni sull'effettiva espressione delle differenti varianti dell'NMNAT3, abbiamo tentato di amplificare tramite RT-PCR i differenti messaggeri FKSG76, NMNAT3v1 and NMNAT3v2 da cDNA di cellule HEK293 tramite l'utilizzo dei primers specifici elencati in **Tabella 2**

Primer	Sequence
1	5' ATGAAGAGCCGAATACCTGTG 3'
2	5' CTAGCTTGTCTTGCCCTCAG 3'
3	5' CGAGACTCGCCGAGCGC 3'
4	5' CTGGTACATTCCCTTATTAATTGGGAGAC 3'
5	5' CACCACAGGTACTCGGCTCTTC 3'

Tabella 2 : Primers utilizzati per gli esperimenti di RT-PCR, come descritto nelle Fig. 9 e 10

Per prima cosa abbiamo utilizzato primers teoricamente in grado di amplificare l'intera ORF delle due varianti FKSG76 e NMNAT3v2 (**Fig. 9**), ma abbiamo ottenuto un solo prodotto di amplificazione con il peso molecolare atteso corrispondente all'intera ORF della variante FKSG76 (**Fig. 10**). Il trascritto NMNAT3v2 è risultato assente anche in differenti tessuti umani quali cervello, muscolo scheletrico e rene (**Fig. 10**).

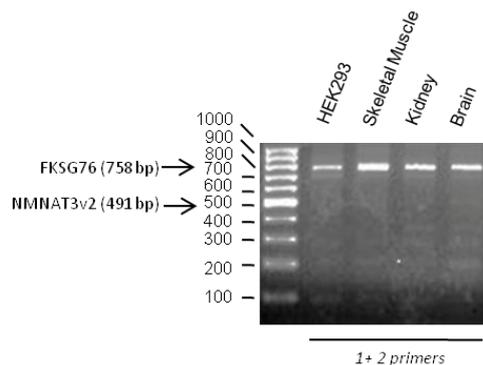


Figura 10 : PCR semiquantitativa che mostra la presenza della banda di 758 bp relativa all'ORF di FKSG76 e l'assenza di quella relativa a NMNAT3v2 di 491 bp in cellule HEK293 e nei tessuti umani di cervello, muscolo scheletrico e rene. Il gel di agarosio è rappresentativo di almeno 4 esperimenti indipendenti

Abbiamo inoltre verificato la presenza del trascritto denominato NMNAT3v1, disegnando degli specifici primers discriminanti: un primer forward in grado di legare una porzione del 5'UTR ed il reverse una regione a cavallo del codone di avvio (**Fig 11**). Abbiamo così ottenuto un prodotto di amplificazione del peso molecolare atteso (**Fig. 12**) che, dopo sequenziamento, ha confermato la sequenza di NMNAT3v1 presente in GenBank.

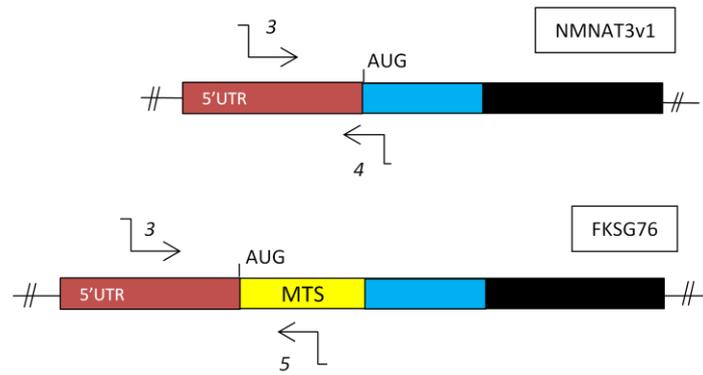


Fig 11: Rappresentazione schematica di una porzione dei trascritti FKSG76 e NMNAT3v1 contenente i rispettivi 5'UTR. I colori rappresentano le regioni di omologia. Sono mostrate le posizioni di annealing dei primers 3, 4, 5 utilizzati per amplificare i frammenti indicati in figura

Alla luce dell'errata localizzazione del gene *fksg76* sul cromosoma 8 e dell'elevata omologia di sequenza tra NMNAT3v1 e FKSG76 (**Fig. 9**), abbiamo poi speculato che questi due messaggeri codificati da *nmnat3* fossero semplicemente due varianti di splicing. In linea con questa ipotesi, utilizzando il primer forward sopra-citato in grado di legare il 5'UTR della variante NMNAT3v1 e un primer reverse che lega una porzione della MTS della variante FKSG76 (**Fig.11**), abbiamo ottenuto un frammento di 147 bp (**Fig. 12**).

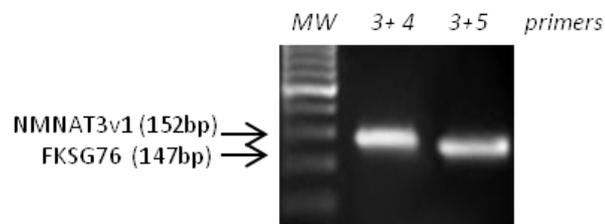


Fig 12: PCR semiquantitativa che indica la presenza delle bande attese di 147 e 151 bp relative ai prodotti di amplificazione delle regioni contenute in FKSG76 e NMNAT3v1 mostrate in Fig. Il gel di agarosio è rappresentativo di almeno 4 esperimenti indipendenti

Il sequenziamento del prodotto di amplificazione ha mostrato una porzione della MTS di FKSG76, un 5'UTR identico a quello della NMNAT3v1 e un frammento di 39 bp compreso tra queste due regioni. Tutti questi dati indicano che il gene *nmnat3* codifica un pre-mRNA da cui originano, tramite splicing alternativo, i due trascritti FKSG76 and NMNAT3v1, ma non NMNAT3v2 (**Fig. 13**).

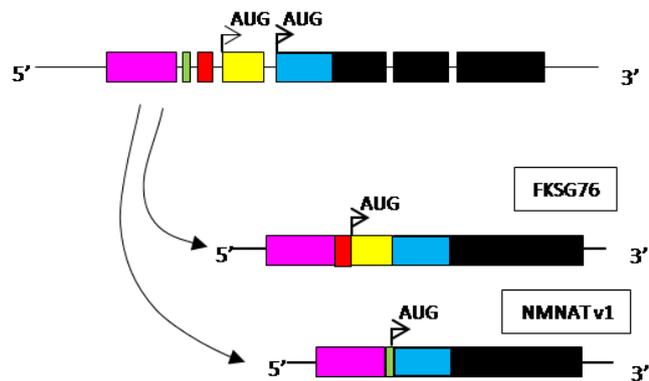


Fig 13: Ricostruzione schematica della struttura del pre-RNA da cui originano i trascritti FKSG76 e NMNAT3v1 tramite splicing alternativo. I colori rappresentano le regioni di omologia.

Un'analisi comparativa dei livelli di espressione tramite real time PCR ha rivelato che NMNAT3v1 FKSG76 sono espressi in modo differente in cellule HEK e nei tessuti umani testati (**Fig.14**).

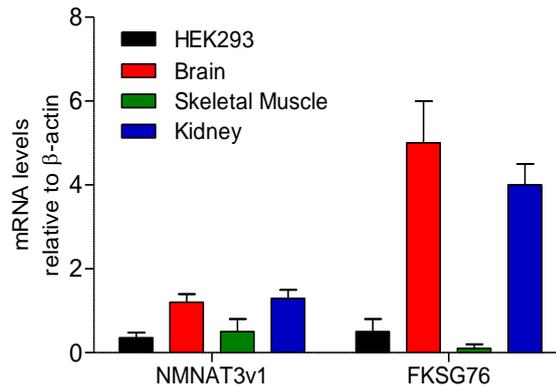
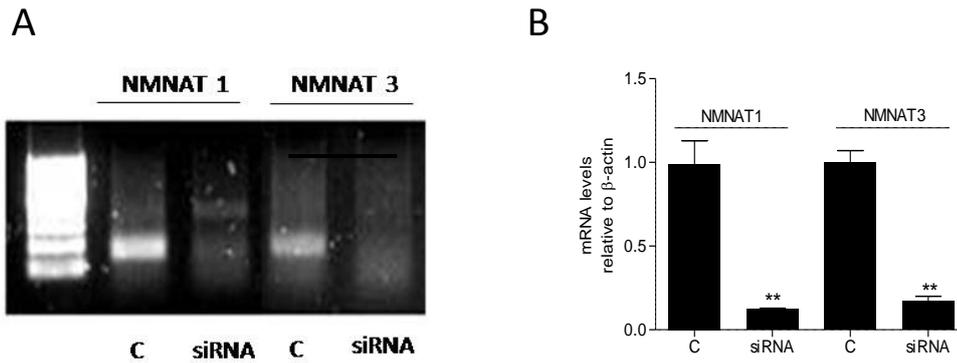


Fig 14: Analisi comparativa dei livelli di espressione dei trascritti per FKSG76 e NMNAT3v1, in HEK293 e differenti tessuti umani. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di 3 esperimenti con differenti campioni umani.

Effetto del silenziamento di NMNAT1 e -3 sull'attività NMNAT e sul contenuto di NAD intracellulare

Come detto in precedenza, la rilevanza funzionale dell'NMNAT3 endogena sull'omeostasi del NAD cellulare e mitocondriale è attualmente sconosciuta. Quindi, per approfondire questo aspetto, abbiamo silenziato l'NMNAT3 utilizzando specifici siRNA disegnati per ridurre entrambi i trascritti (FKSG76 e NMNATv1). Abbiamo inoltre valutato gli effetti del silenziamento di NMNAT1. Per potenziare l'effetto del silenziamento, abbiamo adottato un protocollo "doppio colpo". Le **Figure 15 A, B** mostrano come i siRNA contro NMNAT1 e NMNAT3 siano stati in grado di ridurre drasticamente i livelli di espressione analizzati dopo 72 ore dalla trasfezione.



*Fig. 15: A) PCR semiquantitativa che mostra il silenziamento di NMNAT1 e NMNAT3 operato dai rispettivi siRNA. E' mostrato un esperimento rappresentativo di 5. B) Real time PCR per il silenziamento di NMNAT1 o NMNAT3. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti. $**p < 0.01$ vs control (Student's t test) Per NMNAT3 sia in A che in B sono stati usati siRNA in grado di legare i trascritti FKSG76 e NMNAT3v1 e primers che amplificano entrambe le varianti.*

Abbiamo quindi adottato un saggio enzimatico che misura la formazione di NAD da NMN e ATP per verificare se il silenziamento di NMNAT1 o di NMNAT3 fosse in grado di ridurre l'attività NMN-adenililtransferasica cellulare. Il saggio è specifico per l'NMNAT perchè, come mostrato in figura, siamo stati in grado di rivelare la formazione di NAD nell'omogenato totale solo in presenza di NMN e ATP (**Fig. 16**)

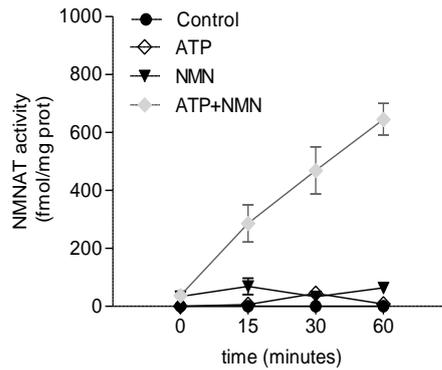


Fig. 16: Attività NMN – adeniltrasferasica totale in un estratto totale di cellule HEK293 e differenti combinazioni di substrati. I punti rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti.

Per questi esperimenti abbiamo utilizzato la linea cellulare HEK293 perché caratterizzata da bassi livelli di espressione dell'isoforma NMNAT2 e, in questo modo, è stato possibile assumere che l'attività totale NMNAT fosse dipendente solo dalle isoforme NMNAT1 e -3. Inaspettatamente, mentre l'attività totale era ridotta in modo significativo in seguito al silenziamento di NMNAT1, rimaneva completamente inalterata in cellule soggette al silenziamento di NMNAT3 (Fig.17).

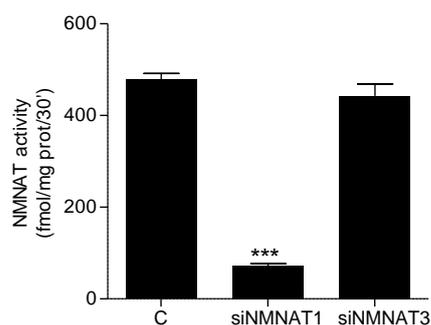
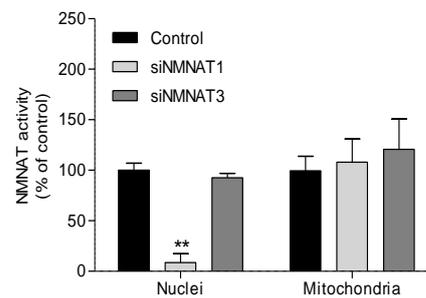


Fig. 17: Effetto del silenziamento di NMNAT1 e NMNAT3 sull'attività NMNAT totale. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control (Student's *t* test)

In linea con questo risultato e con la localizzazione a livello nucleare dell'NMNAT1, la valutazione dell'attività enzimatica nei compartimenti subcellulari ha rivelato la pressochè completa diminuzione dell'attività nella frazione nucleare in seguito a silenziamento di NMNAT1. D'altro canto, non abbiamo osservato alcuna variazione nella formazione di NAD da NMN e ATP nella frazione mitocondriale di cellule esposte al siRNA contro NMNAT3 (**Fig. 18**).



*Fig. 18: Effetto del silenziamento di NMNAT1 e NMNAT3 sull'attività enzimatica nucleare e mitocondriale. L'attività enzimatica nucleare e mitocondriale erano 2430 ± 390 e 37 ± 7 fmol/mg prot./30 minuti. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti. ** $p < 0.01$ vs control (Student's t test)*

Non abbiamo osservato, inoltre, alcun cambiamento nei contenuti di NAD cellulare nelle cellule esposte al siRNA per NMNAT1 che per NMNAT3 dopo 72 ore di silenziamento (**Fig 19**). Il contenuto di NAD intracellulare in seguito al silenziamento di NMNAT1 potrebbe suggerire una cinetica lenta nella resintesi di NAD in questo tipo cellulare.

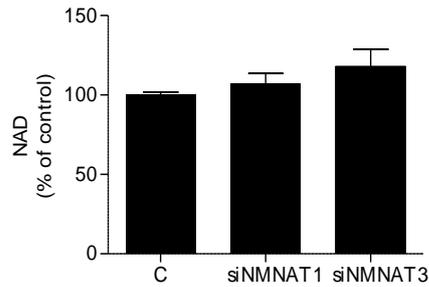
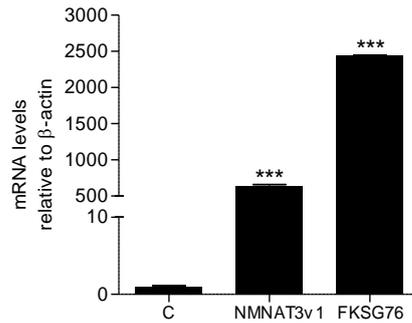


Fig. 19 Effetto del silenziamento di NMNAT1 e NMNAT3 sui contenuti di NAD intracellulari. Il contenuto basale di NAD era 12.6 ± 2 nmol/mg prot. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti.

Effetto dell'overespressione delle due isoforme di NMNAT3 sull'attività NMNAT e sull'omeostasi del NAD

Il silenziamento di NMNAT1 e NMNAT3 indica che, nelle nostre condizioni sperimentali, solo l'NMNAT1 contribuisce alla totale attività NMN-adenililtrasferasica cellulare. Per ottenere ulteriori informazioni sull'effetto delle due isoforme dell'NMNAT3 sull'omeostasi del NAD, abbiamo analizzato l'effetto della trasfezione selettiva di FKSG76 o NMNAT3v1 su differenti parametri cellulari. Gli mRNA per FKSG76 o NMNAT3v1 hanno subito un aumento di circa 60- e 2400 volte nelle cellule trasfettate con i rispettivi plasmidi (**Fig. 20**).



*Fig. 20: Livelli di mRNA per FKSG76 e NMNAT3v1 in seguito alla trasfezione dei rispettivi plasmidi. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti. *** $p < 0.001$ vs control (Student's *t* test)*

Tramite l'utilizzo di un anticorpo policlonale diretto contro l'NMNAT3 ricombinante, abbiamo quindi valutato l'espressione delle due isoforme di NMNAT3 in cellule di controllo e trasfettate. Come mostrato in **Figura 21**, I livelli di proteina di entrambe le isoforme FKSG76 e NMNAT3v1 non hanno raggiunto i limiti di deteazione nelle cellule di controllo. Non è stato possibile rilevare i livelli endogeni di entrambe le proteine neanche in estratti mitocondriali, per cui si può escludere la possibilità di una eccessiva diluizione del campione.

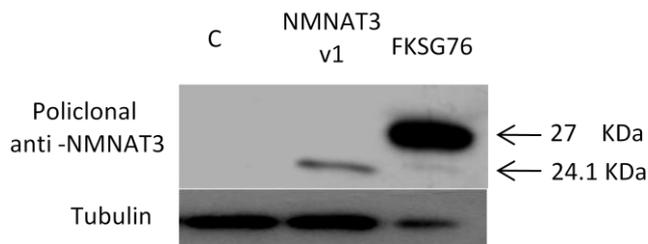


Fig. 21: Western blot per entrambe le isoforme NMNAT3 in cellule trasfettate con il vettore vuoto, con il plasmide per NMNAT3v1 e con quello per FKSG76. La tubulina è mostrata come controllo per il caricamento. La figura è rappresentativa di almeno 4 esperimenti indipendenti.

Al contrario, le bande attese di 27 e 24 kDa corrispondenti alle due distinte isoforme FKSG76 e NMNAT3v1 erano presenti negli estratti di cellule trasfettate

con i corrispondenti plasmidi (**Fig. 21**). La distribuzione intracellulare delle due isoforme NMNAT3 legate ad una sequenza FLAG sono state inoltre valutate tramite immunocitochimica. In linea con la presenza della MTS solo nella isoforma FKSG76 (**Fig. 9**), NMNAT3v1 è risultata essere distribuita uniformemente nei diversi compartimenti cellulari. Al contrario, come precedentemente riportato (Berger et al., 2005), FKSG76 ha mostrato una localizzazione esclusivamente mitocondriale (**Fig. 22**).

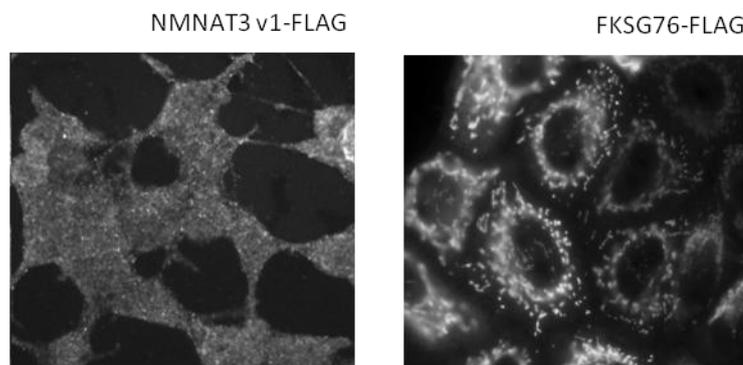


Fig. 22: Immunocitochimica che mostra la localizzazione intracellulare delle due isoforme NMNAT3v1 e FKSG76 in cellule overesprimenti, mediante un anticorpo anti-FLAG. La figura è rappresentativa di almeno 4 esperimenti indipendenti.

Abbiamo inoltre valutato il contributo dell'overespressione di NMNAT3v1 o FKSG76 all'attività NMNAT cellulare. Sorprendentemente, l'attività NMNAT totale non era aumentata nelle cellule trasfettate con NMNAT3v1, mentre era evidente un aumento di circa 800 volte nelle cellule trasfettate con FKSG76 (**Fig. 23**).

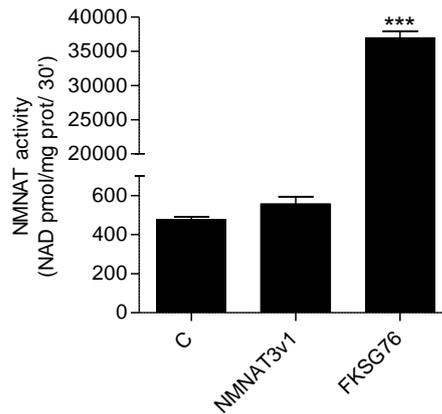


Fig. 23: Attività enzimatica NMNAT totale in seguito alla trasfezione dei plasmidi per NMNAT3v1 e FKSG76. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti. *** $p < 0.001$ vs control (Student's *t* test)

Una successiva analisi in silico della struttura 3D di NMNAT3v1 ha rivelato che la proteina manca di una specifica regione richiesta per legare e orientare in modo appropriato l'ATP per la catalisi enzimatica (**Fig. 24**), spiegando in questo modo perché l'attività NMNAT fosse aumentata solo nelle cellule trasfettate con il plasmide per questa isoforma.

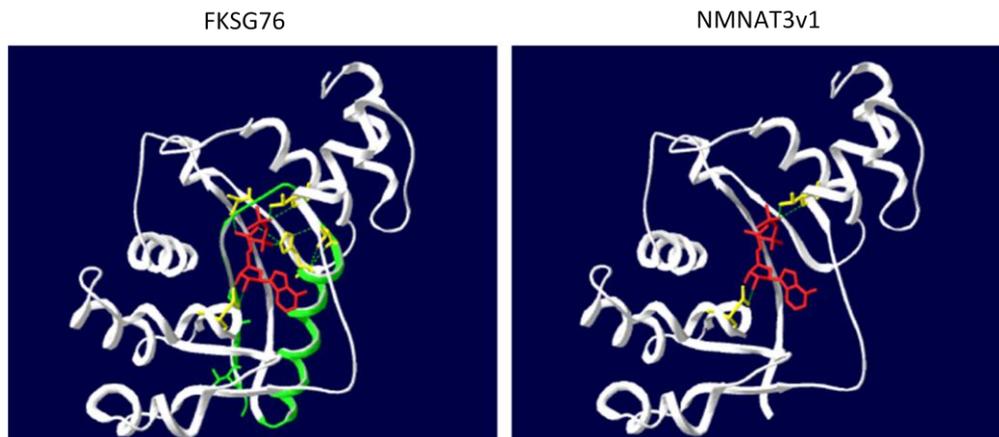
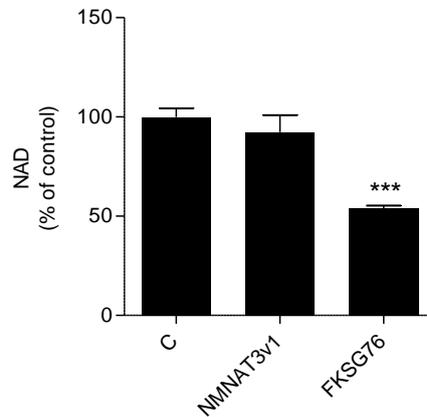


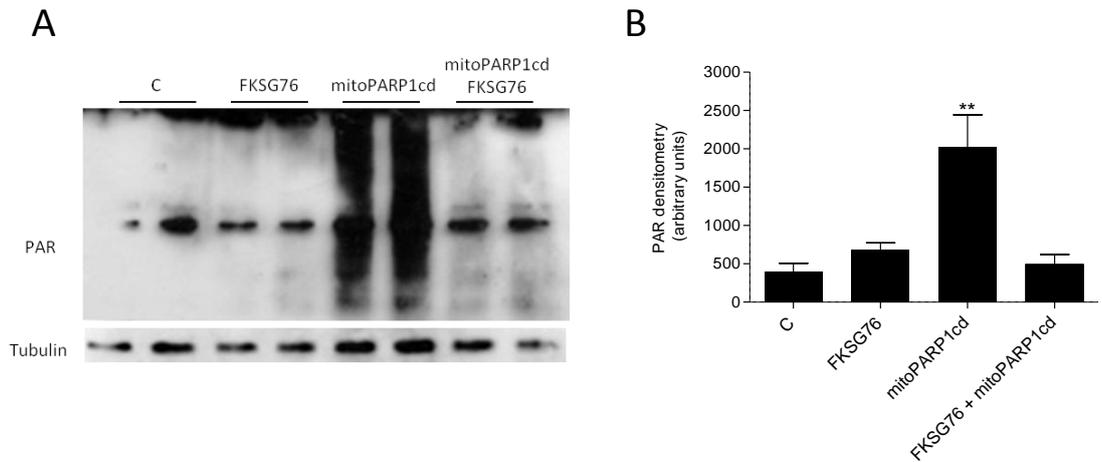
Fig. 24: Struttura delle proteine codificate da NMNAT3v1 e FKSG76. Il sito di legame dell'ATP, assente nella NMNAT3v1, è rappresentato in verde nella FKSG76. I residui aminoacidici che legano l'ATP sono rappresentati in giallo. E' inoltre mostrato l'orientamento dell'ATP (in rosso) nel suo sito di legame.

Coerentemente, i contenuti di NAD non sono cambiati nelle cellule trasfettate con NMNAT3v1 (**Fig. 25**). Le cellule overesprimenti FKSG76, invece, hanno mostrato inaspettatamente circa la metà del contenuto basale di NAD (**Fig. 25**),



*Fig. 25: Contenuti di NAD intracellulari in cellule di controllo e trasfettate con NMNAT3v1 e FKSG76. Il contenuto basale di NAD era 12.6 ± 2 nmol/mg prot.. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti. *** $p < 0.001$ vs control (Student's t test).*

Quindi, per capire se FKSG76 fosse in grado di ridurre il contenuto di NAD a livello mitocondriale, abbiamo utilizzato un metodo recentemente sviluppato nel laboratorio del Prof. Ziegler, in grado di quantificare indirettamente i contenuti di NAD all'interno dell'organello (Dolle et al., 2010). In particolare, abbiamo valutato i livelli di PAR in cellule trasfettate con un particolare costrutto contenente il dominio catalitico di PARP-1 indirizzato nei mitocondri (mitoPARP-1cd) che porta ad massiva produzione di polimero mitocondriale. La quantità di PAR determinata riflette i contenuti di NAD mitocondriale, necessario come substrato enzimatico del costrutto trasfettato. Come mostrato nel Western Blot in **Fig. 26**, le cellule trasfettate con mitoPARP-1cd hanno rivelato un drastico aumento di polimero rispetto a cellule di controllo, il quale era completamente prevenuto dalla cotrasfezione con FKSG76.



*Fig. 26 A) Valutazione dei livelli di poli-ADP-ribosio (PAR) mediante Western Blot in cellule di controllo e in seguito a trasfezione con mitoPARP1cd e/o FKSG76. La tubulina è mostrata come controllo del caricamento. L'immagine è rappresentativa di 5 esperimenti. B) Analisi densitometrica della formazione del PAR mostrata in A. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti. ** $p < 0.01$ vs control (Student's *t* test)*

L'immunocitochimica ha confermato la prevenzione della formazione del PAR mitocondriale in seguito a cotrasfezione con FKSG76 (**Fig. 27**).

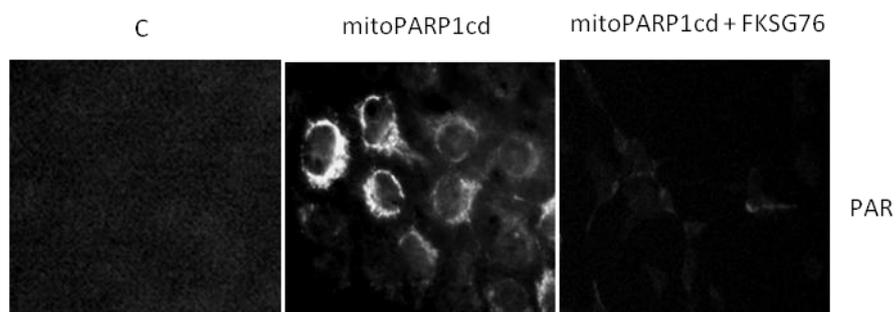
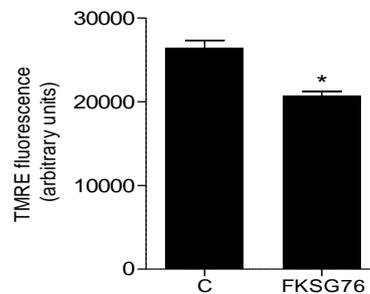


Fig. 27 Immunocitochimica per il PAR in cellule HEK923 di controllo e trasfettate con mitoPARP1cd o/e FKSG76. L'immagine è rappresentativa di 5 esperimenti.

Il NAD mitocondriale svolge un ruolo chiave nella respirazione e nella bioenergetica mitocondriale. In linea con la riduzione del contenuto di NAD mitocondriale, le cellule che overesprimono la FKSG76 hanno mostrato anche una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale (**Fig. 28**).



*Fig. 28 Effetto della trasfezione di FKSG76 sul potenziale di membrana mitocondriale. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 4 esperimenti. * $p < 0.1$ vs control (Student's *t* test)*

Ulteriori tentativi per identificare la proteina NMNAT3 endogena

Per escludere la possibilità di un'eccessiva diluizione di FKSG76 nell'estratto cellulare, abbiamo tentato di immunoprecipitare la proteina da un estratto mitocondriale utilizzando un anticorpo monoclonale di ratto anti-FKSG76. Come mostrato in **Fig 29** non è stato possibile localizzare FKSG76 né nel surnatante né nell'immunoprecipitato ottenuto dall'estratto mitocondriale. Al contrario, la proteina era presente nell'immunoprecipitato ottenuto da cellule overesprimenti l'FKSG76.

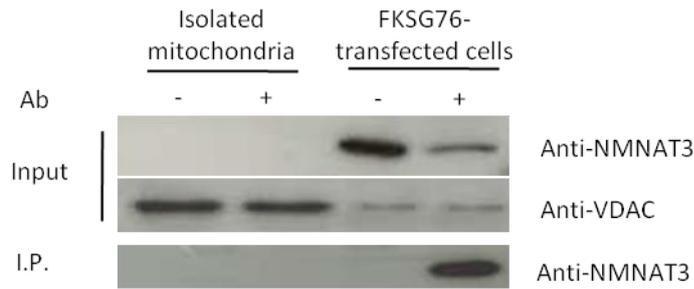


Fig 29 Immunoprecipitazione dell'NMNAT3 da estratto mitocondriale di HEK293 o da estratto totale di cellule overesprimenti FKSG76. VDAC è mostrato come marker mitocondriale.

Una profonda analisi dei 5'UTR degli mRNA FKSG76 e NMNAT3v1 ci ha rivelato la presenza di una upstream ORF (uORF) in entrambi i trascritti (**Fig. 30**)

FKSG76

.....TGCCATGAAGCGGACTGCTGCTCCCTGGCTCCCACTCTGATCTGCTT
 TTCACTCTTGCCCTGTCTCCCAATTAATAAGCAGGGTGTCCACTGGTACAAG
 GGTGGATGTGCCTGATAGATGAAGAGCCGAGTACCTGTGGTGTCTCCGGGC
 CTGTGGCTCCTGTAACCCCATCCCCAACATGCACCTGCGCATGTTTGAGGT
 GGCCAGAAATCACCTACACCAAACATGAATGTACCAGGT.....

NMNAT3v1

.....TGCCATGAAGCGGACTGCTGCTCCCTGGCTCCCACTCTGATCTGCTT
 TTCACTCTTGCCCTGTCTCCCAATTAATAAGGATGTACCAGGT.....

Figura 30: Sequenza iniziale delle ORF di FKSG76 e NMNAT3v1 più una porzione dei rispettivi 5'UTR. La ORF iniziale di FKSG76 è mostrata in giallo (sequenza di targeting mitocondriale) e blu, mentre quella di NMNAT3v1 è mostrata in blu. La sequenza finale del 5'UTR di FKSG76 è mostrata in viola e rosso, mentre quella di NMNAT3v1 è mostrata in viola e verde. Le ATG delle uORF sono sottolineate all'inizio della sequenza viola.

Le uORF possono diminuire l'efficienza di traduzione del messaggero, causando lo stallo dei ribosomi e il conseguente decadimento degli mRNA (Calvo et al., 2009; Morris and Geballe, 2000). Abbiamo quindi studiato il possibile effetto

funzionale delle uORFs identificate in FKSG76 e NMNAT3v1. Per questo scopo, abbiamo clonato un frammento del 5'UTR di FKSG76 e NMNAT3v1 contenente sia la uORF wild type che mutagenizzata (convertendo la ATG in GGG) in un vettore di espressione per la luciferasi (**Fig. 31**).

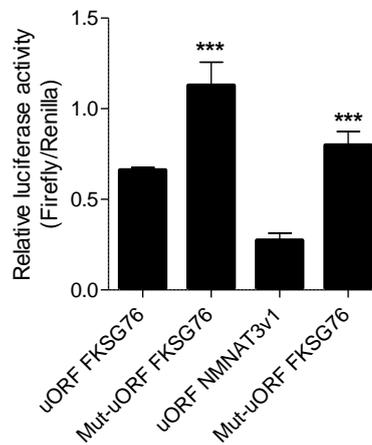


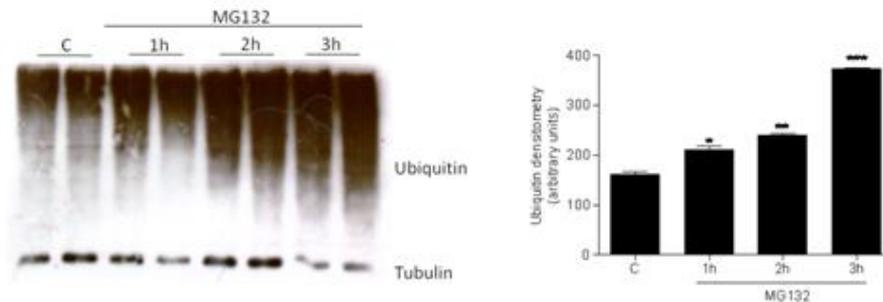
Fig. 31: Il saggio per la luciferasi mostra l'effetto delle uORF e delle uORF mutate (Mut-uORFs) sull'efficienza di traduzione. E' mostrata, inoltre, una rappresentazione schematica dei 5'UTR di FKSG76 e NMNAT3v1 clonati nel plasmide. La sequenza della uORF è rappresentata in rosso.

E' importante notare come la mutagenizzazione della uORF wild type aumenta significativamente l'espressione della luciferasi (**Fig. 31**). Questo risultato suggerisce che la presenza delle uORFs nei trascritti di FKSG76 e NMNAT3v1 diminuisce la loro efficienza di traduzione, coerentemente alla nostra inability di immuolocalizzare le rispettive proteine in condizioni di controllo.

Abbiamo quindi valutato la possibilità che l'NMNAT3 fosse espressa, indotta o stabilizzata in determinate condizioni.

Studi recenti hanno dimostrato, ad esempio, che l'NMNAT in *Drosophila* si comporta come una chaperonina e può essere indotta da shock termico (Ali et al., 2011; Zhai et al., 2008). Questi dati ci hanno portato ad ipotizzare che le proteine endogene FKSG76 e NMNAT3v1 fossero tradotte e prontamente degradate, ma che potessero essere stabilizzate in seguito a stress. Abbiamo quindi tentato di stabilizzare le due proteine inibendo la loro degradazione da parte del proteasoma.

Le **Fig. 32 A, B** mostrano un aumento dei livelli di ubiquitina lineare con il tempo, in seguito all'esposizione di cellule HEK293 all'inibitore del proteasoma MG132, dimostrando l'efficacia del farmaco.



*Fig. 32: A) Accumulo nel tempo delle proteine ubiquitinate in cellule HEK293 in seguito ad esposizione a MG132 10 μ M. La tubulina è mostrata come controllo del caricamento. L'immagine è rappresentativa di almeno 2 esperimenti indipendenti. B) Analisi densitometrica del western blot mostrato in A. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 2 esperimenti. * $p < 0.1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs control (Student's *t* test).*

Ancora, non è stato possibile rilevare la presenza di una banda attribuibile a FKSG76 o NMNAT3v1 nelle cellule esposte a MG132 (**Fig. 33**).

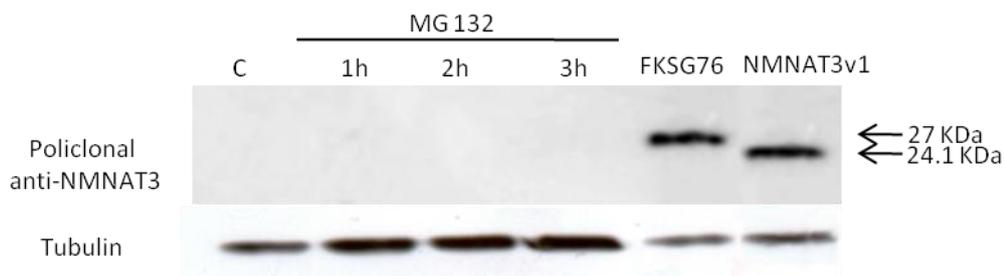


Fig. 33: Western Blot per FKSG76 e NMNAT3v1 in HEK293 in seguito all'esposizione per diversi tempi ad MG132. Sono mostrati i controlli positivi in cellule overesprimenti. La tubulina è mostrata come controllo del caricamento. L'immagine è rappresentativa di almeno 3 esperimenti indipendenti.

Per capire se le NMNAT fossero proteine inducibili, abbiamo poi studiato l'impatto dello shock termico sui livelli di espressione delle varie isoforme a livello trascrizionale. Come mostrato in **Fig. 34** uno shock termico di 30 minuti a 44°C, non ha influenzato i livelli di espressione di NMNAT1 e 2. Abbiamo ottenuto un risultato del tutto analogo, quantificando i trascritti per NMNAT3 mediante l'utilizzo di primers in grado di amplificare sia FKSG76 che NMNAT3v1 (**Fig. 34**).

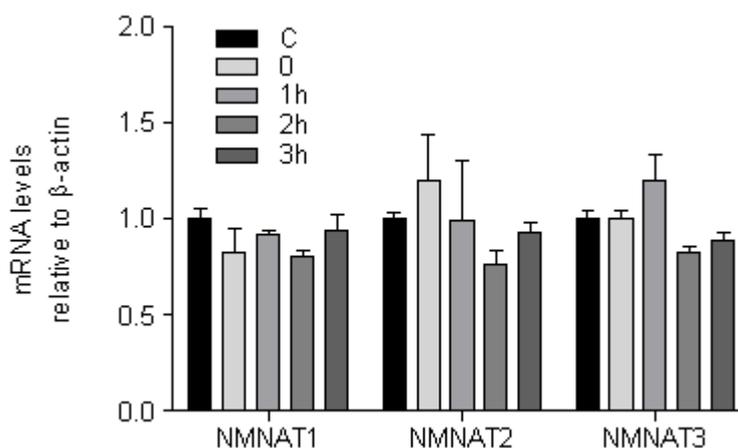
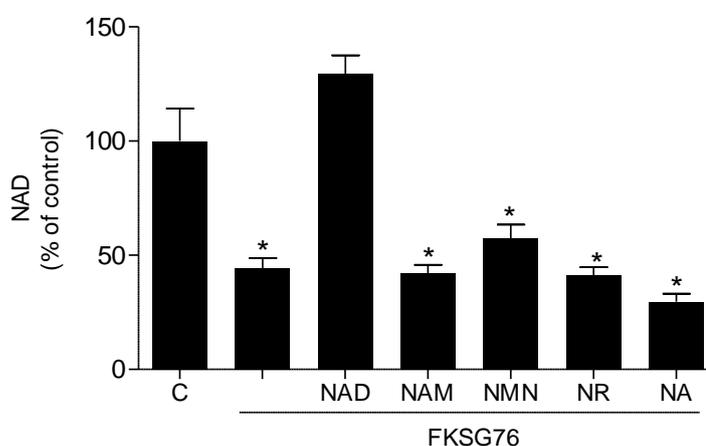


Fig. 34 Livelli di espressione di NMNAT1, -2, -3 a differenti tempi dallo shock termico (44°C per 30 minuti). Per NMNAT3 sono stati usati primers in grado di amplificare entrambe le isoforme. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti.

Effetto del NAD esogeno e dei suoi precursori sul contenuto di NAD cellulare e mitocondriale in cellule overesprimenti FKSG76

Sebbene l'NMNAT3 sia considerata la proteina chiave del mantenimento del NAD mitocondriale, i dati del nostro studio contraddicono le precedenti teorie sull'omeostasi del NAD all'interno dell'organello. Per ottenere nuove informazioni sull'origine del NAD mitocondriale, abbiamo cercato di capire se il dinucleotide o i suoi precursori aggiunti nel medium di coltura fossero in grado di prevenire la deplezione di NAD nelle cellule trasfettate con FKSG76. E' interessante notare che, l'aggiunta di 1 mM di NAD nel medium di coltura è stato in grado di prevenire completamente la deplezione di NAD mitocondriale. Al contrario, la stessa concentrazione dei precursori del NAD quali Nam, NMN, nicotinamide riboside and NA non sono risultati efficaci nel prevenire la diminuzione (**Fig. 35**).



*Fig. 35 Livelli di NAD in cellule di controllo e trasfettate con FKSG76 esposte a NAD, NMN, NR, NAM, NA 1 mM 48h. Il contenuto basale di NAD era 12.6 ± 2 nmol/mg prot. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti. * $p < 0.1$ vs control (Student's t test).*

Abbiamo quindi verificato se la prevenzione della deplezione di NAD da parte del NAD esogeno avvenisse all'interno dei mitocondri, utilizzando il costrutto mitoPARP1cd descritto in precedenza. Ancora, il NAD esogeno era in grado di prevenire completamente la riduzione della formazione di PAR nei mitocondri di cellule cotrasfettate con FKSG76 e mitoPARP-1cd, un effetto non riscontrato con i precursori (**Fig. 36**).

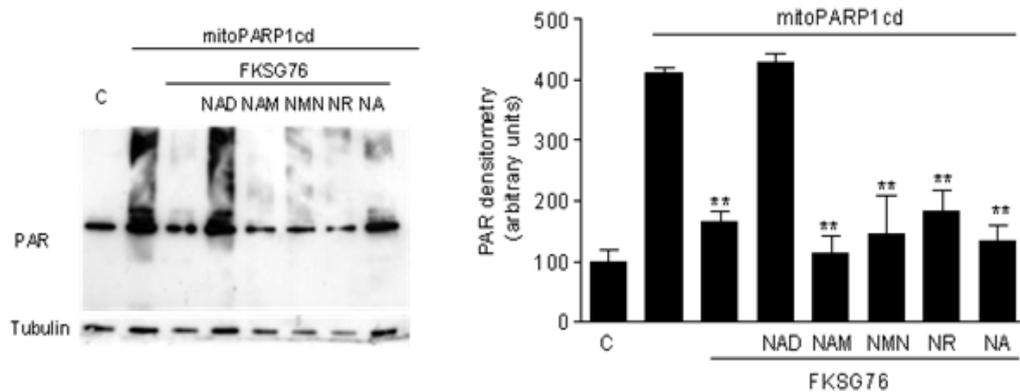


Fig. 36 a) Western Blot per la valutazione dell'effetto di NAD, NAM, NMN, NR e NA 1 mM 48h sulla diminuzione del PAR mitocondriale in seguito a cotrasfezione di FKSG76 in cellule trasfettate con mitoPARP1cd. La tubulina è mostrata come controllo del caricamento. L'immagine è rappresentativa di almeno 5 esperimenti indipendenti. B) Analisi densitometrica dell'esperimento mostrato in A. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di almeno 3 esperimenti. ** $p < 0.01$ vs control (Student's *t* test).

PARTE II: Modulazione farmacologica della poli(ADP)ribosilazione in un modello murino di encefalomiopatia mitocondriale

Effetto del trattamento con il pan-inibitore PARP KU-0058948 sulla progressione della malattia in topi deficienti per Ndufs4

Visto che l'iperattivazione di PARP-1 mediata dai ROS potrebbe contribuire alla patogenesi dei disordini mitocondriali (Fato et al., 2008) e che gli enzimi PARP-1 e PARP-2 sono stati recentemente identificati come importanti regolatori dell'omeostasi metabolica (Bai et al., 2011a; Bai et al., 2011b), abbiamo valutato l'effetto del trattamento con il potente pan-inibitore PARP sviluppato da Astrazeneca, denominato KU-0058948, sulla progressione della malattia sviluppata dai topi Ndufs4 knockout.

In **Fig. 37** è rappresentato il protocollo sperimentale utilizzato: dopo essere stati genotipizzati a p20, i topi sono stati suddivisi dopo lo svezzamento (intorno a p30) in un gruppo di controllo (trattato con il solo veicolo) ed un gruppo cui è stato somministrato il farmaco cronicamente 5 mg/ Kg intraperitoneo una volta al giorno per tutta la durata della vita (intorno a p60).

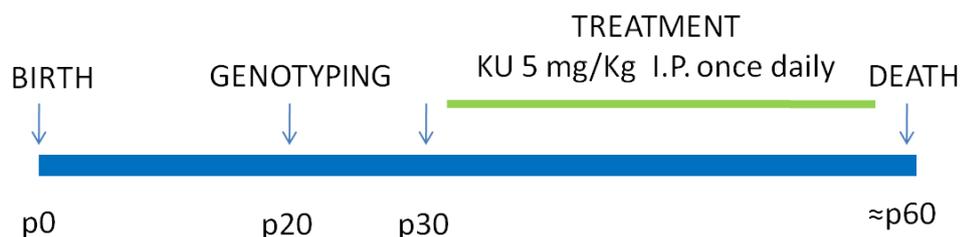


Fig. 37 Rappresentazione schematica del protocollo sperimentale utilizzato per la somministrazione del pan-inibitore PARP KU-0058948 sul modello murino di malattia mitocondriale

Dal momento che topi PARP-1 knockout sono caratterizzati da un minore accumulo di grassi e maggiore consumo energetico (Bai et al., 2011b), abbiamo per prima cosa analizzato l'effetto del trattamento cronico con il PARP inibitore sulla crescita dei topi Ndufs4 knockout. Come mostrato in **Fig. 38**, il trattamento non ha avuto un effetto significativo sul peso dei topi Ndufs4, che si aggirava intorno ai 12 g all'inizio del trattamento (p30) e diminuiva con il progredire della malattia in entrambi i gruppi analizzati.

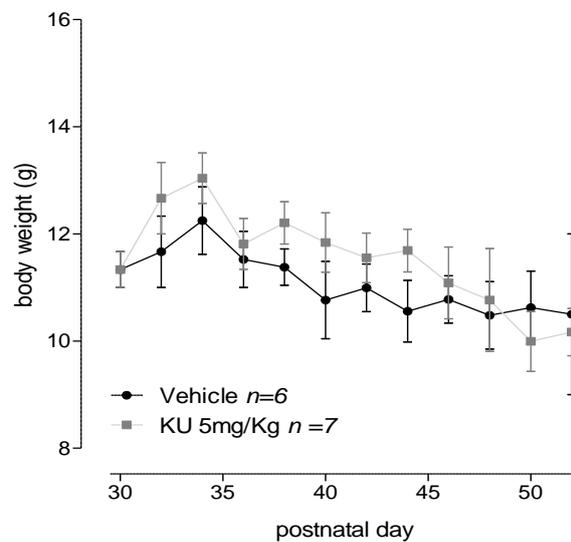


Fig. 38 Effetto del trattamento con il PARP inibitore KU-0058948 sul peso dei topi Ndufs4 knockout. Ogni punto rappresenta la media di n =6 per il veicolo e n = 7 per i trattati con Ku 5 mg/Kg

Abbiamo inoltre valutato, in doppio-cieco, la progressione della malattia sulla base della comparsa e della severità dei segni neurologici (Quintana et al., 2010). E' interessante notare che topi trattati con Ku 5 mg/Kg da p30 hanno mostrato un ritardo significativo nel peggioramento dei sintomi neurologici, che si è manifestato intorno a p38 nei topi di controllo e intorno a p44 nei topi trattati con il farmaco (**Fig. 39**)

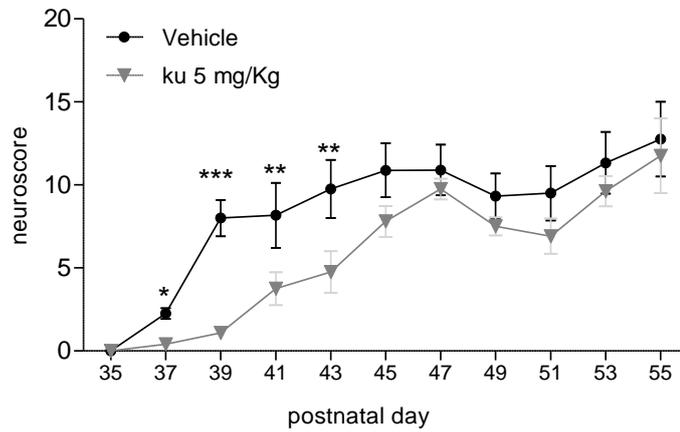


Fig. 39: Effetto del trattamento con il PARP inibitore KU-0058948 sulla severità dei sintomi neurologici di topi *Ndufs4* knockout. Ogni punto rappresenta la media di $n=6$ per il veicolo e $n=7$ per i trattati con Ku 5 mg/Kg

In particolare, il trattamento è stato in grado di migliorare in modo significativo l'ataxia e l'equilibrio nei topi *Ndufs4* KO, ma non ha avuto effetti rilevanti sulla forza muscolare e sulla coordinazione motoria delle zampe posteriori (Fig. 40). Questi topi, infatti, con il progredire della malattia, perdono il riflesso naturale di allineare le zampe posteriori quando sospesi per la coda (Kruse et al., 2008)

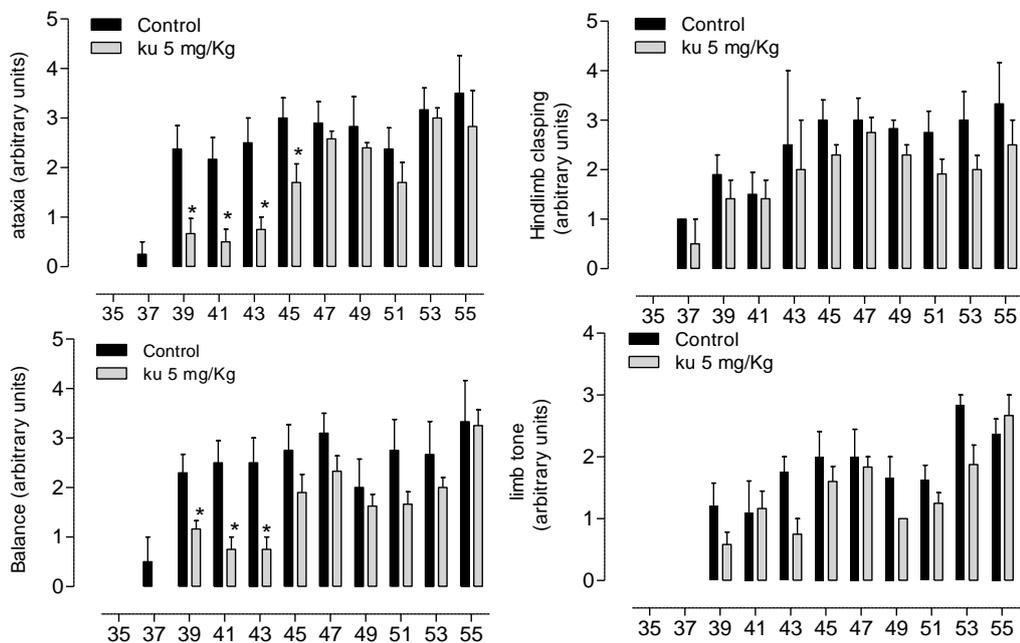
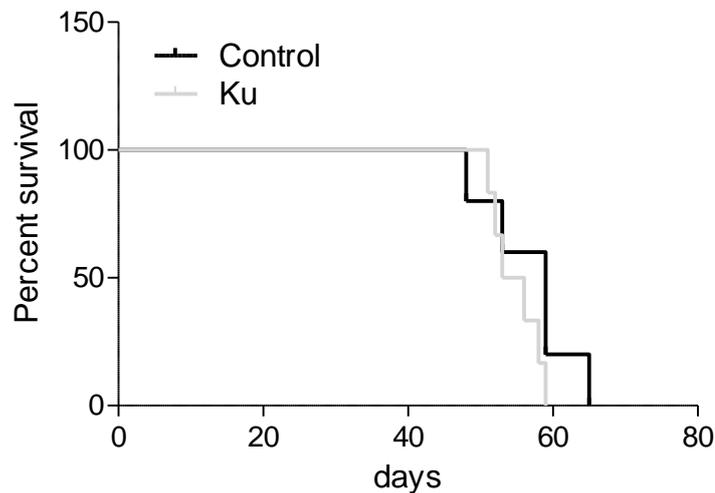


Fig. 40 Effetto del trattamento con il PARP inibitore KU-0058948 sulla severità dei sintomi neurologici di topi *Ndufs4* knockout, in particolare atassia (A), movimento delle zampe posteriori (B), equilibrio (C) e forza muscolare (D). Ogni

colonna rappresenta la media \pm SEM di $n = 6$ per il veicolo e $n = 7$ per i trattati
* $p < 0.1$ vs control (Student's t test).

Purtroppo, l'effetto neuroprotettivo dell'inibizione PARP è evidente solo nello stadio precoce della malattia (**Fig. 39, 40**). A partire da p44 circa, infatti, la severità sintomi dei topi di entrambi i gruppi aumenta inevitabilmente (**Fig. 39, 40**). Questo risultato si traduce con la mancata efficacia del trattamento nel prolungare la sopravvivenza dei topi *Ndufs4* KO (**Fig. 41**).

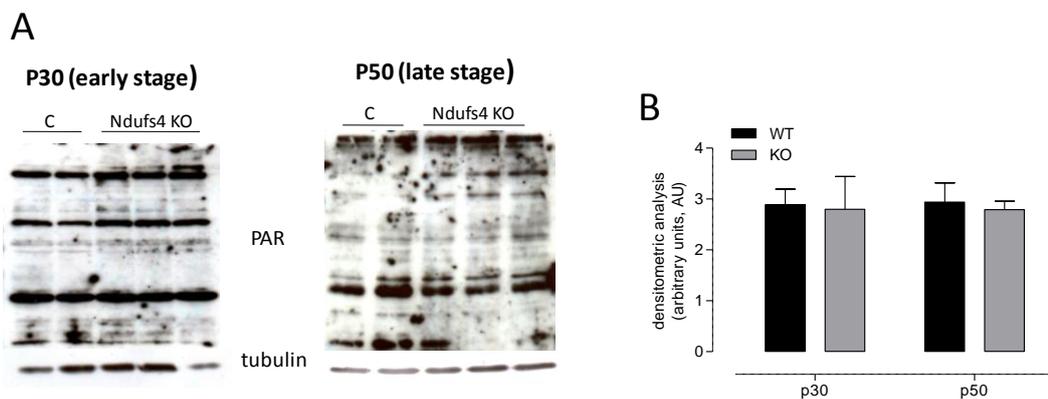


*Fig. 41: Effetto del trattamento con il PARP inibitore KU-0058948 sulla sopravvivenza di topi *Ndufs4* knockout. $n = 6$ per il veicolo e $n = 7$ per i trattati con Ku 5 mg/Kg*

Valutazione dell'attivazione PARP e dei livelli di NAD nel cervello di topi deficienti per *Ndufs4*

Visto il risultato del trattamento con il PARP inibitore, abbiamo voluto in seguito indagare il possibile meccanismo molecolare alla base dell'effetto neuroprotettivo osservato. Per prima cosa, abbiamo voluto verificare l'ipotesi di una possibile

iperattivazione PARP, causata dalla disfunzione della catena respiratoria mitocondriale, nei topi *Ndufs4* knockout. A questo scopo, abbiamo analizzato, tramite Western Blot, il livello di poli-ADP-ribosilazione delle proteine contenute in estratti di cervello di topi WT e KO a differenti stadi della malattia, come indice di attivazione PARP. Come mostrato in **Fig. 42 A, B** l'analisi densitometrica delle bande relative alle proteine poli-ADP-ribosilate contenute in estratti proteici da cervelli di topi WT e KO a p30 (stadio precoce della malattia) e a p50 (stadio terminale della malattia) non mostrano differenze nei livelli di poli-ADP-ribosilazione, escludendo l'ipotesi di un'iperattivazione PARP mediata da ROS in condizione di deficit della catena respiratoria.



*Fig. 42 A) Valutazione dei livelli di poli-ADP-ribosio (PAR) mediante Western Blot in estratti di cervello di topi WT e *Ndufs4* KO a differenti stadi della malattia. La tubulina è mostrata come controllo del caricamento. L'immagine è rappresentativa di 2 esperimenti indipendenti eseguiti su campioni provenienti da 4 topi di controllo e sei topi KO per ogni condizione. B) Analisi densitometrica del PAR degli esperimenti mostrati in A. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di 4 (C) e 6 (KO) animali.*

Per confermare questo dato, abbiamo inoltre valutato se, nei cervelli di topi *Ndufs4* KO, fossero alterati i contenuti totali di NAD, substrato della PARP, come conseguenza di una possibile iperattivazione dell'enzima. Come mostrato in **Fig.**

43 i livelli di NAD nel cervello di topi deficienti per *Ndufs4* a differenti stadi della malattia non è alterato in modo significativo.

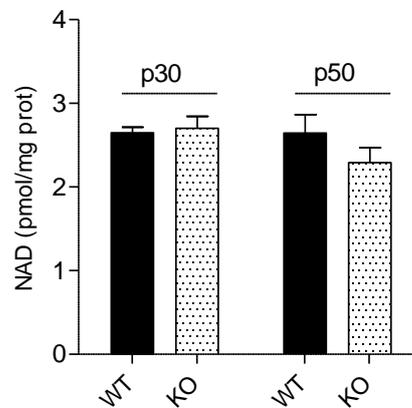


Fig. 43 Valutazione dei contenuti di NAD in estratti di cervello di topi WT e *Ndufs4* KO a differenti stadi della malattia. Le colonne rappresentano la media \pm SEM di 4 (C) e 6 (KO) animali.

Generazione e caratterizzazione del fenotipo di topi doppi knockout per *Ndufs4* e *PARP1*

Esclusa l'ipotesi di una iperattivazione di PARP-1 in condizione di deficit mitocondriale (Fato et al., 2008), abbiamo in seguito indagato se la neuroprotezione ottenuta tramite l'inibizione PARP all'esordio della malattia fosse dovuta al blocco dell'effetto inibitorio esercitato dagli enzimi PARP-1 e PARP-2 sul metabolismo energetico (Bai et al., 2011a; Bai et al., 2011b).

Per valutare quindi l'effetto di una soppressione selettiva delle isoforme PARP, abbiamo approfittato della disponibilità di topi PARP1 knockout (Wang et al., 1995), per generare topi doppi knockout per entrambi *Ndufs4* e PARP-1. A questo scopo, topi eterozigoti per *Ndufs4* sono stati accoppiati con i topi PARP-1 KO per generare topi doppi eterozigoti (**Fig. 44**). Quest'ultimi, apparentemente sani e indistinguibili da topi WT dal punto di vista fenotipico, sono stati accoppiati per ottenere una colonia stabile di topi PARP-1 KO eterozigoti per *Ndufs4*. Le

nidiate di questi topi erano caratterizzate per il 25% da topi doppi KO per PARP-1 e Ndufs4, che sono stati valutati dal punto di vista neuropatologico.

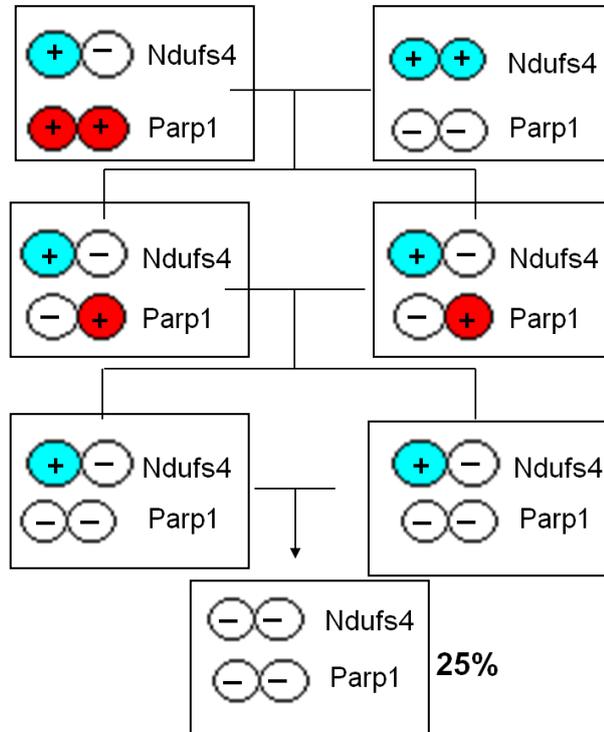


Fig. 44 Descrizione schematica del protocollo seguito per la generazione del fenotipo di topi doppi knockout per Ndufs4 e PARP1

Mentre topi PARP-1 knockout sono stati descritti precedentemente come più magri rispetto a topi WT perché caratterizzati da un minore accumulo di grassi e maggiore consumo energetico (Bai et al., 2011b), topi doppi KO per Ndufs4 e PARP1 non si differenziano nel peso rispetto a topi KO solo per Ndufs4 (**Fig. 45**)

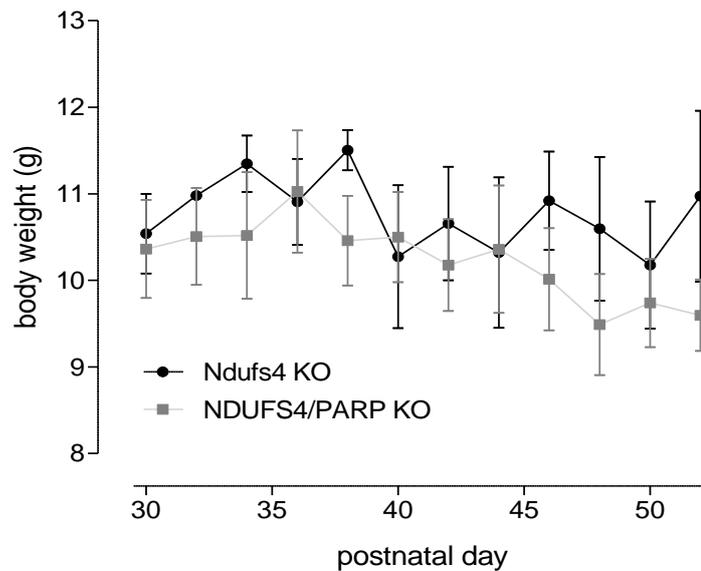


Fig.45 Effetto della soppressione genica di PARP1 e NDUFS4 sul peso, rispetto a topi Ndufs4 knockout. Ogni punto rappresenta la media di 3 animali

Come i topi KO per NDUFS4, i topi doppi KO sono caratterizzati da ritardo nella crescita e perdita reversibile del pelo, ma non presentano ulteriori sintomi fino alla quarta/quinta settimana di vita. A partire dal trentesimo giorno dopo la nascita (P30) diventano letargici e incapaci di mantenere la temperatura corporea. Dal P35 mostrano una severa atassia e debolezza muscolare. Tra P30 e P50 smettono di nutrirsi e acquistare peso e mostrano un peggioramento dell'atassia. Come mostrato in **Fig. 46** infatti, lo score neurologico di topi doppi KO non presenta differenze significative rispetto a quello di topi Ndufs4 KO della stessa età.

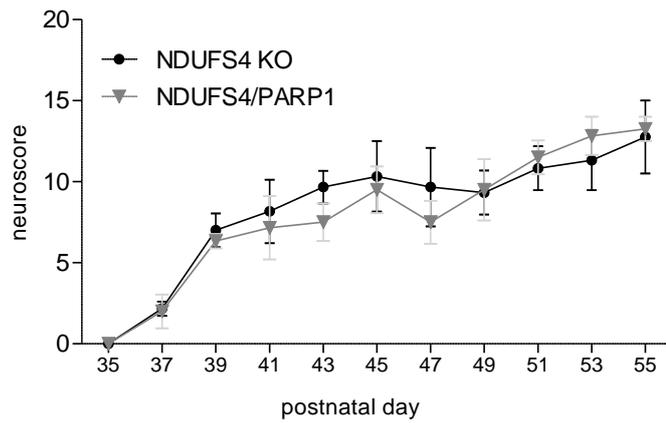


Fig. 46: Effetto della soppressione genica di PARP-1 nei topi *Ndufs4* KO sulla severità dei sintomi neurologici. Ogni punto rappresenta la media di 3 animali.

La soppressione di entrambi i geni, inoltre, non influenza la sopravvivenza dei topi, che muoiono in seguito al peggioramento dei sintomi intorno a p 60 (Fig. 47)

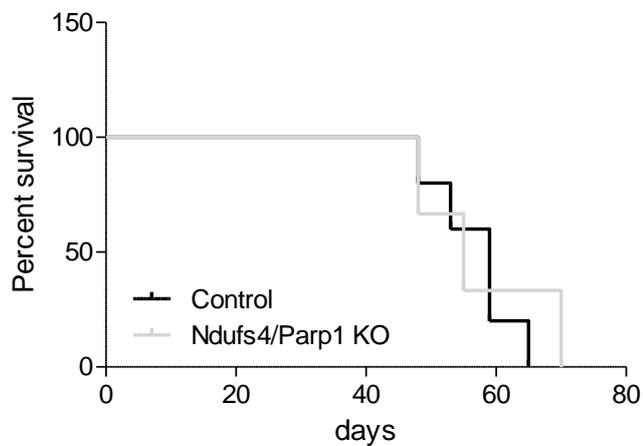


Fig. 47 Effetto della soppressione genica di PARP-1 nei topi *Ndufs4* KO sulla sopravvivenza. $n=3$ animali per gruppo.

DISCUSSIONE

L'obiettivo della prima parte del nostro studio è stato quello di valutare la rilevanza funzionale della NMNAT3 endogena nel mantenimento del pool di NAD mitocondriale.

Per la prima volta, al contrario di quanto riportato su GenBank, abbiamo identificato un unico gene localizzato sul cromosoma 3 che codifica le due varianti di splicing denominate NMNAT3v1 e FKSG76. Al contrario, non siamo stati in grado di trovare nessuna evidenza molecolare o funzionale delle proteine NMNAT3v1 e FKSG76 endogene. Quando espressa artificialmente, NMNAT3v1 appare citosolica e inattiva, mentre FKSG76 è localizzata nei mitocondri e riduce, anziché aumentare, il contenuto di NAD nel compartimento. Inoltre, abbiamo dimostrato che il NAD esogeno, e non i suoi precursori, è capace di prevenire la deplezione del pool di NAD mitocondriale causato dall'espressione artificiale di FKSG76.

L'NMNAT3 è stata identificata inizialmente tramite omologia di sequenza con l'NMNAT1 (Zhang et al., 2003). In seguito la maggior parte delle informazioni sulla localizzazione e l'attività dell'NMNAT3 sono state ottenute mediante l'utilizzo di vettori plasmidici di espressione (Berger et al., 2005; Yahata et al., 2009; Zhang et al., 2003). Per quanto di nostra conoscenza, solo uno studio ha valutato l'espressione della NMNAT3 endogena a livello proteico (Di et al., 2010). Nello specifico, il gruppo del prof. Magni ha valutato la presenza delle differenti isoforme dell'NMNAT nei globuli rossi umani. Queste cellule sembrano essere caratterizzate dall'assenza dell'isoforma NMNAT2, da livelli molto bassi per l'NMNAT1 e da un'elevata espressione di NMNAT3. E' interessante notare che, come sottolineano gli autori, i reticolociti vanno incontro a complessi eventi di splicing alternativo durante la differenziazione che, in teoria, potrebbero essere alla base di un processamento specifico di queste cellule del pre-mRNA di nmnat3 (Di et al., 2010).

Inoltre, nel lavoro di Barile et al (Barile et al., 1996), è stata riportata la presenza di una attività adeniltrasferasica nella matrice mitocondriale di epatociti di ratto. In questo studio, però, è stata misurata la formazione di NADH da NMN e ATP piuttosto che di NAD⁺. Inoltre, l'NMN sembra funzionare come precursore del NAD mitocondriale solo in caso di permeabilizzazione dell'organello con digitonina, indicando che il mononucleotide intatto non è in grado di attraversare la membrana interna mitocondriale (Barile et al., 1996). Quindi, dovrebbe essere esercitata molta cautela nell'interpretare questi dati come effettiva evidenza di una NMNAT mitocondriale, essenziale nella regolazione del pool di NAD mitocondriale. Ciò nonostante, un recente lavoro suggerisce, come unico precursore del NAD mitocondriale, l'NMN citosolico (Nikiforov et al., 2011). In linea con questo dato, abbiamo trovato in estratti mitocondriali un'attività di sintesi di NAD a partire da NMN e ATP, ma quest'ultima non è assolutamente alterata dal silenziamento concomitante di NMNAT3v1 e FKSG76. E' possibile che i mitocondri contengano un enzima, probabilmente appartenente alla superfamiglia delle nucleotidiltrasferasi α/β fosfodiesterasi (Garavaglia et al., 2002), capace di catalizzare la nucleotidilazione dell'NMN in vitro, ma che in realtà possiede un ruolo fisiologico differente. In linea con questa ipotesi, la Km dell'attività enzimatica NMNAT mitocondriale riportata da Barile e collaboratori (Barile et al., 1996) è 18.2 μ M mentre quella dell'NMNAT3 ricombinante risulta essere 209 μ M (Berger et al., 2005).

I dati ottenuti tramite l'overespressione di FKSG76 in cellule di controllo e cellule trasfettate con mitoPARP1cd indicano che questa variante dell'NMNAT3 è una proteina mitocondriale ma opera in senso opposto, degradando il NAD piuttosto che sintetizzandolo. Queste osservazioni sono in linea con un precedente studio sui parametri cinetici delle tre isoforme NMNAT che mostra un valore di Vmax di FKSG76 per la sintesi di NAD 4 volte più basso rispetto a quello per il

catabolismo del NAD (3.6 e 12.8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot. rispettivamente) (Berger et al., 2005). L'esatta concentrazione di ATP, NMN, NAD e PPI presenti nella matrice mitocondriale attualmente non è nota. Tuttavia, bisogna tenere in considerazione che la continua estrusione di ATP attraverso l'ANT (adenine nucleotide translocator) (Klingenberg, 2008) e la scarsa permeabilità della membrana interna mitocondriale all'NMN (Barile et al., 1996) potrebbero limitare la disponibilità di questi substrati per l'NMNAT3. Questa condizione omeostatica, insieme all'elevato contenuto di NAD e PPI nei mitocondri, potrebbe spiegare perché l'FKSG76 lavora nella direzione opposta, quando presente nell'organello. Questa caratteristica è stata per la prima volta interpretata come una possibile strategia per ottenere ATP dal NAD in determinate condizioni, come in caso di ligazione del DNA mitocondriale o collasso energetico (Oei and Ziegler, 2000). Alla luce del ruolo chiave del NAD nella respirazione mitocondriale e nel corretto funzionamento dell'organello, è comprensibile che una proteina capace di depletare il pool di NAD mitocondriale come la FKSG76 possa compromettere severamente l'omeostasi dell'organello e la sopravvivenza cellulare. In linea con questo, non è stato possibile rilevare la proteina endogena FKSG76 in Western Blot o tramite immunoprecipitazione, suggerendo che questo messaggero possa non essere tradotto. Infatti, nel 5'UTR di entrambi FKSG76 e NMNAT3v1, abbiamo identificato una uORF in grado di ridurre l'efficienza traduzionale dei messaggeri. L'impatto quantitativo di questa uORF sulla traduzione di FKSG76 e NMNAT3v1 endogene è sconosciuto, ma considerando che questa è in grado di diminuire significativamente l'espressione della luciferasi guidata dal potente promotore SV40, l'impatto negativo sui livelli fisiologici di proteina potrebbe essere con molte probabilità ancor più rilevante. Infatti, alla presenza dell'uORF è stata associata anche la completa soppressione dell'espressione proteica (Calvo et al., 2009). È interessante notare che l'elevato grado di conservazione delle

uORF nell'uomo è considerato come l'evidenza di un importante, anche se sconosciuto, ruolo funzionale (Calvo et al., 2009; Morris and Geballe, 2000). Noi ipotizziamo che una possibile ragione della presenza delle uORF nei trascritti per l'NMNAT3 è la prevenzione dell'espressione deleteria di FKSG76 nei mitocondri. Altrimenti, questi trascritti potrebbero essere in realtà dei long non coding RNA aventi un ruolo regolatorio non ancora caratterizzato (Qureshi and Mehler, 2012; Wapinski and Chang, 2011). Sebbene ulteriori studi siano necessari per chiarire il perché della presenza dei due trascritti per NMNAT3, i nostri dati mostrano la loro presenza in differenti tessuti sottolineando il loro potenziale ruolo funzionale. Inoltre, il fatto che gli mRNA per NMNAT3v1 e FKSG76 mostrano livelli di espressione differenziati nei diversi tessuti analizzati, avvalorano l'ipotesi del loro ruolo regolatorio non codificante (Wapinski and Chang, 2011).

Un dogma generalmente accettato nella biologia cellulare è che i mitocondri siano completamente impermeabili al NAD (Di Lisa and Ziegler, 2001). Oggi, recenti scoperte indicano che questo principio dovrebbe essere rivisitato. Infatti, sono stati identificati trasportatori del NAD sulla membrana interna mitocondriale di lieviti e piante (Palmieri et al., 2009; Todisco et al., 2006). Inoltre, non sono ancora stati identificati trasportatori per i precursori del NAD sulla membrana plasmatica né mitocondriale. Inoltre, l'impossibilità del NAD di attraversare la membrana mitocondriale è stata dimostrata solo in vitro, e potrebbe essere semplicemente dovuta al fatto che, in queste condizioni sperimentali, i sistemi di trasporto sono compromessi o mancano di molecole di scambio necessarie per il loro funzionamento. In linea con questa osservazione, entrambi i trasportatori per il NAD mitocondriale di lievito e piante lavorano come scambiatori di nucleotidi (Palmieri et al., 2009; Todisco et al., 2006). Ancora, l'aumento delle concentrazioni di NAD nello spazio extracellulare di cellule in coltura fa aumentare i contenuti di NAD mitocondriale e stimola la respirazione cellulare

(Pittelli et al., 2011). Infine, un precedente lavoro dimostra la presenza di flussi di NAD attraverso la membrana interna mitocondriale, correlati allo stato metabolico cellulare (Rustin et al., 1996; Rustin et al., 1997). Tutte queste osservazioni, più i dati del presente studio che indicano che solo il NAD (e non i suoi precursori metabolici) è in grado di prevenire la deplezione di NAD mitocondriale indotta da FKSG76, suggeriscono che, come nelle piante e nel lievito, anche nelle cellule di mammifero possa essere presente un trasportatore per il NAD non ancora identificato. Il fatto che l'NMNAT3 sia assente nei mitocondri e che idrolizzi il NAD quando artificialmente espressa rafforza notevolmente l'ipotesi che il pool di NAD mitocondriale sia di origine citoplasmatica.

Questo studio evidenzia quindi la necessità di valutare nel prossimo futuro il possibile ruolo regolatorio degli RNA non codificanti FKSG76 e NMNAT3v1 e di identificare l'identità molecolare dei trasportatori di NAD nei mitocondri delle cellule di mammifero.

L'obiettivo della seconda parte del nostro studio è stato quello di valutare l'effetto dell'inibizione di un processo NAD- dipendente, la poli(ADP)ribosilazione, in un modello murino di encefalomiopia mitocondriale.

Per la prima volta, abbiamo sottoposto topi KO per NDUFS4, una subunità del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, al trattamento un pan-inibitore PARP, denominato KU-0058948, recentemente sviluppato dall'Astrazeneca.

Il trattamento non ha avuto effetti significativi sulla crescita dei topi Ndufs4 KO e non ne ha prolungato la durata della vita. Ciò nonostante, i topi trattati con KU-0058948 hanno mostrato un significativo ritardo nel peggioramento dei segni caratteristici del deficit mitocondriale. Tra i differenti parametri valutati, l'effetto neuroprotettivo si è manifestato in modo più evidente sull'atassia e l'equilibrio, che risultano notevolmente migliorati rispetto a topi trattati con il solo veicolo.

Molteplici meccanismi molecolari possono essere alla base della neuroprotezione mediata dall'inibizione PARP.

In primo luogo, in caso di deficit mitocondriale, i ROS prodotti da un trasporto elettronico inefficiente potrebbero essere la causa della iperattivazione di PARP1, con conseguente deplezione di NAD e ATP, squilibrio energetico e morte neuronale (Fato et al., 2008). In questo senso, PARP1 potrebbe rappresentare un mediatore chiave nella patogenesi delle malattie mitocondriali che attualmente, nonostante i progressi ottenuti nella caratterizzazione genetica delle patologie, è pressochè sconosciuta. I nostri risultati dimostrano però, che nel sistema nervoso centrale dei topi Ndufs4 KO, PARP-1 non è iperattivata. Infatti, i livelli di PAR, prodotto dell'enzima, e di NAD, suo substrato, non sono alterati nel cervello dei topi KO rispetto a topi WT a differenti stadi della malattia. Quindi, l'enzima non possiede un ruolo attivo nella patogenesi della malattia e

l'effetto neuroprotettivo non è attribuibile alla prevenzione dello squilibrio energetico cellulare, che consegue all'iperattivazione di PARP1.

Recenti studi effettuati dal gruppo del Prof. Auwerx dell' Ecole Polytechnique Fédérale di Losanna, hanno dimostrato che PARP1 e PARP2 agiscono negativamente sul metabolismo energetico cellulare (Bai et al., 2011a; Bai et al., 2011b).

In particolare, l'attività basale di PARP1 sembra limitare la disponibilità di NAD per l'enzima SIRT1 (Bai et al., 2011b). Quest'ultimo regola la biogenesi mitocondriale mediante la deacetilazione del suo bersaglio molecolare PCG-1 α , un coattivatore trascrizionale che riveste un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo energetico. La soppressione genica di PARP1 ha quindi come conseguenza un'aumentata disponibilità di NAD per l'attività di SIRT1, un'aumentata biogenesi mitocondriale e l'incremento del metabolismo energetico. Per verificare se l'effetto neuroprotettivo osservato nel nostro modello sperimentale fosse da attribuire, quindi, all'attivazione dell'asse SIRT1- PCG-1 α in seguito ad inibizione PARP, abbiamo generato topi doppi KO per Ndufs4 e PARP1. In questo modo, ci è stato possibile valutare l'effetto dell'inibizione selettiva della sola PARP1 e distinguere un potenziale effetto del farmaco su una delle altre isoforme della famiglia. Il fenotipo dei topi doppi knockout per Ndufs4 e PARP1 è risultato essere del tutto paragonabile a quello di topi knockout per la sola Ndufs4. Questo dimostra che PARP1 non è responsabile dell'effetto protettivo ottenuto con il trattamento con il PARP inibitore e che quest'ultimo potrebbe essere quindi mediato da un'altra isoforma PARP.

Come accennato in precedenza, anche PARP2 è in grado di regolare negativamente il metabolismo energetico cellulare influenzando la deacetilazione mediata da SIRT1, ma con un differente meccanismo molecolare rispetto a PARP1 (Bai et al., 2011a). PARP2, infatti, regola direttamente i livelli di

espressione di SIRT1 agendo come regolatore negativo sul suo promotore. La delezione genica di PARP-2 nei topi aumenta i livelli di SIRT1, promuove il consumo energetico e aumenta il contenuto mitocondriale. Questo terzo meccanismo potrebbe quindi essere quello alla base dell'effetto osservato nel nostro modello sperimentale o ancora un processo epigenetico finemente regolato da un altro enzima della famiglia PARP. Ulteriori studi sono necessari per comprendere le basi molecolari dell'effetto neuroprotettivo del KU-0058948 nei topi Ndufs4 KO. In futuro, per rispondere ai numerosi quesiti ancora aperti, abbiamo intenzione di valutare l'effetto del trattamento sui livelli di SIRT1 e PGC-1 α , di generare una seconda colonia di topi transgenici doppi knockout per PARP2 e Ndufs4 e di testare altri inibitori PARP, più o meno selettivi, sul modello animale di malattia mitocondriale.

BIBLIOGRAFIA

- Alano CC, Garnier P, Ying W, Higashi Y, Kauppinen TM, and Swanson RA. 2010. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *J Neurosci* 30:2967-2978.
- Alano CC, Tran A, Tao R, Ying W, Karliner JS, and Swanson RA. 2007. Differences among cell types in NAD(+) compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes. *J Neurosci Res* 85:3378-3385.
- Alano CC, Ying W, and Swanson RA. 2004. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 279:18895-18902.
- Ali YO, McCormack R, Darr A, and Zhai RG. 2011. Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase is a stress response protein regulated by the heat shock factor/hypoxia-inducible factor 1alpha pathway. *J Biol Chem* 286:19089-19099.
- Alvarez-Gonzalez R, and Jacobson MK. 1987. Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. *Biochemistry* 26:3218-3224.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, and Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- Anderson SL, Chung WK, Frezzo J, Papp JC, Ekstein J, Dimauro S, and Rubin BY. 2008. A novel mutation in NDUFS4 causes Leigh syndrome in an Ashkenazi Jewish family. *J Inherit Metab Dis* 31 Suppl 2:S461-S467.
- Andreu AL, Bruno C, Shanske S, Shtilbans A, Hirano M, Krishna S, Hayward L, Systrom DS, Brown RH, Jr., and Dimauro S. 1998. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology* 51:1444-1447.
- Bai P, Canto C, Brunyanszki A, Huber A, Szanto M, Cen Y, Yamamoto H, Houten SM, Kiss B, Oudart H, Gergely P, Menissier-de Murcia J, Schreiber V, Sauve AA, and Auwerx J. 2011a. PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab* 13:450-460.
- Bai P, Canto C, Oudart H, Brunyanszki A, Cen Y, Thomas C, Yamamoto H, Huber A, Kiss B, Houtkooper RH, Schoonjans K, Schreiber V, Sauve AA, Menissier-de Murcia J, and Auwerx J. 2011b. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab* 13:461-468.
- Barile M, Passarella S, Danese G, and Quagliariello E. 1996. Rat liver mitochondria can synthesize nicotinamide adenine dinucleotide from nicotinamide mononucleotide and ATP via a putative matrix nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochem Mol Biol Int* 38:297-306.

- Belenky P, Bogan KL, and Brenner C. 2007. NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci* 32:12-19.
- Benit P, Goncalves S, Dassa EP, Briere JJ, and Rustin P. 2008a. The variability of the harlequin mouse phenotype resembles that of human mitochondrial-complex I-deficiency syndromes. *PLoS ONE* 3:e3208.
- Benit P, Goncalves S, Dassa EP, Briere JJ, and Rustin P. 2008b. The variability of the harlequin mouse phenotype resembles that of human mitochondrial-complex I-deficiency syndromes. *PLoS ONE* 3:e3208.
- Berger F, Lau C, Dahlmann M, and Ziegler M. 2005. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* 280:36334-36341.
- Berger F, Ramirez-Hernandez MH, and Ziegler M. 2004. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* 29:111-118.
- Berger NA. 1985. Poly (ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* 101:4-15.
- Bieganowski P, and Brenner C. 2004. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* 117:495-502.
- Blander G, and Guarente L. 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73:417-435.
- Bohlega S, Tanji K, Santorelli FM, Hirano M, al-Jishi A, and Dimauro S. 1996. Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy. *Neurology* 46:1329-1334.
- Calvo SE, Pagliarini DJ, and Mootha VK. 2009. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7507-7512.
- Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, and Kroemer G. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84:215-222.
- Chambon P, WEILL JD, and Mandel P. 1963. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 11:39-43.
- Cheung EC, Joza N, Steenaart NA, McClellan KA, Neuspiel M, McNamara S, Maclaurin JG, Rippstein P, Park DS, Shore GC, McBride HM, Penninger JM, and Slack RS. 2006. Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *EMBO J* 25:4061-4073.

- Chiarugi A. 2002. PARP-1: killer or conspirator? The suicide hypothesis revisited. *Trends Pharmacol Sci* 23:122-129.
- Chiarugi A, Dolle C, Felici R, and Ziegler M. 2012. The NAD metabolome - a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* 12:741-752.
- Cipriani G, Rapizzi E, Vannacci A, Rizzuto R, Moroni F, and Chiarugi A. 2005. Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 280:17227-17234.
- Corda D, and Di GM. 2003. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J* 22:1953-1958.
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, and Hamel CP. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26:207-210.
- Di Lisa F, Bernardi P, Canton M, and Barile M. 2001. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 276:2571-2575.
- Di Lisa F, and Ziegler M. 2001. Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD metabolism. *FEBS Lett* 492:4-8.
- Di SM, Galassi L, and Magni G. 2010. Unique expression pattern of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isozymes in red blood cells. *Blood Cells Mol Dis* 45:33-39.
- Dolle C, Niere M, Lohndal E, and Ziegler M. 2010. Visualization of subcellular NAD pools and intra-organellar protein localization by poly-ADP-ribose formation. *Cell Mol Life Sci* 67:433-443.
- Dubern B, Broue P, Dubuisson C, Cormier-Daire V, Habes D, Chardot C, Devictor D, Munnich A, and Bernard O. 2001. Orthotopic liver transplantation for mitochondrial respiratory chain disorders: a study of 5 children. *Transplantation* 71:633-637.
- Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, and Chinnery PF. 2008. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet* 83:254-260.
- Fato R, Bergamini C, Leoni S, Strocchi P, and Lenaz G. 2008. Generation of reactive oxygen species by mitochondrial complex I: implications in neurodegeneration. *Neurochem Res* 33:2487-2501.

Formentini L, Macchiarulo A, Cipriani G, Camaioni E, Rapizzi E, Pellicciari R, Moroni F, and Chiarugi A. 2009. Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure. *J Biol Chem* 284:17668-17676.

Garavaglia S, D'Angelo I, Emanuelli M, Carnevali F, Pierella F, Magni G, and Rizzi M. 2002. Structure of human NMN adenylyltransferase. A key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *J Biol Chem* 277:8524-8530.

Giles RE, Blanc H, Cann HM, and Wallace DC. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6715-6719.

Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kuhl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter E, Haag F, and Koch-Nolte F. 2002. The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci* 11:1657-1670.

Goto Y, Nonaka I, and Horai S. 1990. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348:651-653.

Grahnert A, Friedrich M, Pfister M, Haag F, Koch-Nolte F, and Hauschildt S. 2002. Mono-ADP-ribosyltransferases in human monocytes: regulation by lipopolysaccharide. *Biochem J* 362:717-723.

Hayaishi O, and Ueda K. 1977. Poly(ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins. *Annu Rev Biochem* 46:95-116.

Holt IJ, Harding AE, Petty RK, and Morgan-Hughes JA. 1990. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 46:428-433.

Houtkooper RH, and Auwerx J. 2012. Exploring the therapeutic space around NAD⁺. *J Cell Biol* 199:205-209.

Imai S. 2009. The NAD World: a new systemic regulatory network for metabolism and aging--Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance. *Cell Biochem Biophys* 53:65-74.

Imai S, and Guarente L. 2010. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci* 31:212-220.

Kapsa R, Thompson GN, Thorburn DR, Dahl HH, Marzuki S, Byrne E, and Blok RB. 1994. A novel mtDNA deletion in an infant with Pearson syndrome. *J Inher Metab Dis* 17:521-526.

Kiejna A, Dimauro S, Adamowski T, Rymaszewska J, Leszek J, and Pachalska M. 2002. Psychiatric symptoms in a patient with the clinical features of MELAS. *Med Sci Monit* 8:CS66-CS72.

- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, and Ackerman SL. 2002a. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419:367-374.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, and Ackerman SL. 2002b. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419:367-374.
- Klingenberg M. 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta*.
- Koch-Nolte F, Haag F, Braren R, Kuhl M, Hoovers J, Balasubramanian S, Bazan F, and Thiele HG. 1997. Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins. *Genomics* 39:370-376.
- Krupitza G, and Cerutti P. 1989. Poly(ADP-ribosylation) of histones in intact human keratinocytes. *Biochemistry* 28:4054-4060.
- Kruse SE, Watt WC, Marcinek DJ, Kapur RP, Schenkman KA, and Palmiter RD. 2008. Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab* 7:312-320.
- Lapucci A, Pittelli M, Rapizzi E, Felici R, Moroni F, and Chiarugi A. 2011. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a nuclear epigenetic regulator of mitochondrial DNA repair and transcription. *Mol Pharmacol* Published ahead of print.
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, and Clayton DA. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18:231-236.
- Lau C, Dolle C, Gossmann TI, Agledal L, Niere M, and Ziegler M. 2010. Isoform-specific targeting and interaction domains in human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferases. *J Biol Chem* 285:18868-18876.
- Leshinsky-Silver E, Lebre AS, Minai L, Saada A, Steffann J, Cohen S, Rotig A, Munnich A, Lev D, and Lerman-Sagie T. 2009. NDUFS4 mutations cause Leigh syndrome with predominant brainstem involvement. *Mol Genet Metab* 97:185-189.
- Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM, Janssen AJ, Triepels RH, Sengers RC, and van den Heuvel LP. 2000. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat* 15:123-134.
- Magni G, Orsomando G, Raffelli N, and Ruggieri S. 2008. Enzymology of mammalian NAD metabolism in health and disease. *Front Biosci* 13:6135-6154.
- Matsuoka T, Maeda H, Goto Y, and Nonaka I. 1991. Muscle coenzyme Q10 in mitochondrial encephalomyopathies. *Neuromuscul Disord* 1:443-447.

Mita S, Schmidt B, Schon EA, Dimauro S, and Bonilla E. 1989. Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9509-9513.

Morris DR, and Geballe AP. 2000. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* 20:8635-8642.

Moss J, Stanley SJ, Nightingale MS, Murtagh JJ, Jr., Monaco L, Mishima K, Chen HC, Williamson KC, and Tsai SC. 1992. Molecular and immunological characterization of ADP-ribosylarginine hydrolases. *J Biol Chem* 267:10481-10488.

Nikiforov A, Dolle C, Niere M, and Ziegler M. 2011. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem* 286:21767-21778.

Oei SL, and Ziegler M. 2000. ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J Biol Chem* 275:23234-23239.

Palmieri F, Rieder B, Ventrella A, Blanco E, Do PT, Nunes-Nesi A, Trauth AU, Fiermonte G, Tjaden J, Agrimi G, Kirchberger S, Paradies E, Fernie AR, and Neuhaus HE. 2009. Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J Biol Chem* 284:31249-31259.

Palmieri L, Alberio S, Pisano I, Lodi T, Meznaric-Petrusa M, Zidar J, Santoro A, Scarcia P, Fontanesi F, Lamantea E, Ferrero I, and Zeviani M. 2005. Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 14:3079-3088.

Peterson JE, Larew JS, and Graves DJ. 1990. Purification and partial characterization of arginine-specific ADP-ribosyltransferase from skeletal muscle microsomal membranes. *J Biol Chem* 265:17062-17069.

Petruzzella V, and Papa S. 2002. Mutations in human nuclear genes encoding for subunits of mitochondrial respiratory complex I: the NDUFS4 gene. *Gene* 286:149-154.

Pfeffer G, Majamaa K, Turnbull DM, Thorburn D, and Chinnery PF. 2012. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD004426.

Pittelli M, Felici R, Pitozzi V, Giovannelli L, Bigagli E, Cialdai F, Romano G, Moroni F, and Chiarugi A. 2011. Pharmacological effects of exogenous NAD on mitochondrial bioenergetics, DNA repair, and apoptosis. *Mol Pharmacol* 80:1136-1146.

- Pittelli M, Formentini L, Faraco G, Lapucci A, Rapizzi E, Cialdai F, Romano G, Moneti G, Moroni F, and Chiarugi A. 2010. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase: cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool. *J Biol Chem* 285:34106-34114.
- Procaccio V, and Wallace DC. 2004. Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology* 62:1899-1901.
- Quintana A, Kruse SE, Kapur RP, Sanz E, and Palmiter RD. 2010. Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10996-11001.
- Qureshi IA, and Mehler MF. 2012. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 13:528-541.
- Raffaelli N, Sorci L, Amici A, Emanuelli M, Mazzola F, and Magni G. 2002. Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 297:835-840.
- Revollo JR, Grimm AA, and Imai SI. 2004. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem*.
- Rotig A, Bourgeron T, Chretien D, Rustin P, and Munnich A. 1995. Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Hum Mol Genet* 4:1327-1330.
- Rustin P, Chretien D, Parfait B, Rotig A, and Munnich A. 1997. Nicotinamide adenine dinucleotides permeate through mitochondrial membranes in human Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes. *Mol Cell Biochem* 174:115-119.
- Rustin P, Parfait B, Chretien D, Bourgeron T, Djouadi F, Bastin J, Rotig A, and Munnich A. 1996. Fluxes of nicotinamide adenine dinucleotides through mitochondrial membranes in human cultured cells. *J Biol Chem* 271:14785-14790.
- Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, and Elpeleg O. 2001. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 29:342-344.
- Santorelli FM, Gagliardi MG, Dionisi-Vici C, Parisi F, Tessa A, Carozzo R, Piemonte F, Pfeiffer K, Schagger H, and Bertini E. 2002. Hypertrophic cardiomyopathy and mtDNA depletion. Successful treatment with heart transplantation. *Neuromuscul Disord* 12:56-59.
- Sasaki Y, Araki T, and Milbrandt J. 2006. Stimulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthetic pathways delays axonal degeneration after axotomy. *J Neurosci* 26:8484-8491.

- Sauve AA. 2008. NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther* 324:883-893.
- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, and Chinnery PF. 2004. The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 1659:115-120.
- Schriner SE, Ogburn CE, Smith AC, Newcomb TG, Ladiges WC, Dolle ME, Vijg J, Fukuchi K, and Martin GM. 2000. Levels of DNA damage are unaltered in mice overexpressing human catalase in nuclei. *Free Radic Biol Med* 29:664-673.
- Schwartz M, and Vissing J. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347:576-580.
- Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, and Verdin E. 2002. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* 158:647-657.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz H, Hickey R, Malkas L, Applegren N, Wu Y, Bers G, and Smulson ME. 1996. The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry* 35:11622-11633.
- Sims JL, Berger SJ, and Berger NA. 1983. Poly(ADP-ribose) Polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Biochemistry* 22:5188-5194.
- Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, and Larsson C. 2001. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 28:223-231.
- Stein LR, and Imai S. 2012. The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* 23:420-428.
- Sue CM, Lipsett LJ, Crimmins DS, Tsang CS, Boyages SC, Presgrave CM, Gibson WP, Byrne E, and Morris JG. 1998. Cochlear origin of hearing loss in MELAS syndrome. *Ann Neurol* 43:350-359.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, and Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.

Tein I, Dimauro S, Xie ZW, and De Vivo DC. 1993. Valproic acid impairs carnitine uptake in cultured human skin fibroblasts. An in vitro model for the pathogenesis of valproic acid-associated carnitine deficiency. *Pediatr Res* 34:281-287.

Todisco S, Agrimi G, Castegna A, and Palmieri F. 2006. Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281:1524-1531.

van Empel VP, Bertrand AT, van der Nagel R, Kostin S, Doevendans PA, Crijns HJ, de WE, Sluiter W, Ackerman SL, and De Windt LJ. 2005a. Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. *Circ Res* 96:e92-e101.

van Empel VP, Bertrand AT, van der Nagel R, Kostin S, Doevendans PA, Crijns HJ, de WE, Sluiter W, Ackerman SL, and De Windt LJ. 2005b. Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. *Circ Res* 96:e92-e101.

Van GG, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, and Van BC. 2001. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 28:211-212.

Wallace DC. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488.

Wallace DC. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39:359-407.

Wallace DC. 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem* 76:781-821.

Wallace DC, Fan W, and Procaccio V. 2010. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 5:297-348.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, and Nikoskelainen EK. 1988a. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242:1427-1430.

Wallace DC, Zheng XX, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM, and Hopkins LC. 1988b. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55:601-610.

Wang ZQ, Auer B, Stingl H, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M, and Wagner EF. 1995. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Gene Dev* 9:509-520.

- Wapinski O, and Chang HY. 2011. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol* 21:354-361.
- Williamson DH, Lund P, and Krebs HA. 1967. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* 103:514-527.
- Yahata N, Yuasa S, and Araki T. 2009. Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase expression in mitochondrial matrix delays Wallerian degeneration. *J Neurosci* 29:6276-6284.
- Yang H, Yang T, Baur JA, Perez E, Matsui T, Carmona JJ, Lamming DW, Souza-Pinto NC, Bohr VA, Rosenzweig A, de Cabo R, Sauve AA, and Sinclair DA. 2007a. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell* 130:1095-1107.
- Yang T, Chan NY, and Sauve AA. 2007b. Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells. *J Med Chem* 50:6458-6461.
- Zhai RG, Zhang F, Hiesinger PR, Cao Y, Haueter CM, and Bellen HJ. 2008. NAD synthase NMNAT acts as a chaperone to protect against neurodegeneration. *Nature* 452:887-891.
- Zhang X, Kurnasov OV, Karthikeyan S, Grishin NV, Osterman AL, and Zhang H. 2003. Structural characterization of a human cytosolic NMN/NaMN adenylyltransferase and implication in human NAD biosynthesis. *J Biol Chem* 278:13503-13511.
- Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De B, I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM, and Shoubridge EA. 1998. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 20:337-343.
- Zolkiewska A, Nightingale MS, and Moss J. 1992. Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11352-11356.
- Zolkiewska A, Okazaki IJ, and Moss J. 1994. Vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *Mol Cell Biochem* 138:107-112.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, and Vance JM. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36:449-451.

PRODUZIONE SCIENTIFICA

1. **Felici R**, Lapucci A, Ramazzotti M, Chiarugi A. *Insights into molecular and functional properties of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-3 reveal new hints of NAD homeostasis inside mitochondria*. 2013 Under review
2. Muzzi M, Blasi F, Masi A, Coppi E, Traini C, **Felici R**, Pittelli M, Cavone L, Pugliese AM, Moroni F, Chiarugi A. *Neurological basis of AMP-dependent thermoregulation and its relevance to central and peripheral hyperthermia*. Cereb Blood Flow Metab. 2013 Feb;33(2):183-90
3. Chiarugi A, Dölle C, **Felici R**, Ziegler M. *The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology*. Nat Rev Cancer. 2012 Nov;12(11):741-52.
4. Muzzi M, **Felici R**, Cavone L, Gerace E, Minassi A, Appendino G, Moroni F, Chiarugi A. *Ischemic neuroprotection by TRPV1 receptor-induced hypothermia*. J Cereb Blood Flow Metab. 2012 Jun;32(6):978-82
5. Pittelli M, **Felici R**, Pitozzi V, Giovannelli L, Bigagli E, Cialdai F, Romano G, Moroni F, Chiarugi A. *Pharmacological effects of exogenous NAD on mitochondrial bioenergetics, DNA repair, and apoptosis*. Mol Pharmacol. 2011 Dec;80(6):1136-46.
6. Lapucci A, Pittelli M, Rapizzi E, **Felici R**, Moroni F, Chiarugi A. *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a nuclear epigenetic regulator of mitochondrial DNA repair and transcription*. Mol Pharmacol. 2011 Jun;79(6):932-40