

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

*Ruolo di calcineurina in astrociti ippocampali murini: studio del complesso CaNA α -PERK-eIF2 α
nei siti di contatto fra reticolo endoplasmatico e mitocondrio*

Relatore

Prof.ssa Laura Paola Ferilde TAPELLA

Candidato

Martina CHECCHIN

SESSIONE AUTUNNALE A.A 2023/2024

*A mamma e papà,
per tutto l'amore e il supporto che mi avete dato ogni giorno,
per tutti gli sforzi e i sacrifici che avete fatto per me.
Avete reso possibile questo traguardo.
Spero di rendervi sempre orgogliosi di me.*

INDICE

Abbreviazioni	1
Introduzione	7
1.1 Gli astrociti	9
1.1.1 Astrociti: funzioni fisiologiche nel sistema nervoso centrale	10
1.2 La calcineurina: principale hub citosolico di Ca ²⁺ negli astrociti	12
1.2.1 Struttura, localizzazione e attivazione della calcineurina	12
1.2.2 Calcineurina astrogliale: attività trascrizionale e modulatoria della proteostasi	14
1.3 Il ruolo di CaN nell'UPR e l'interazione con PERK e eIF2 α	18
1.4 I siti di contatto fra reticolo endoplasmatico e mitocondrio	20
1.4.1 L'influenza della distanza tra reticolo endoplasmatico e mitocondrio ed i metodi per la sua misurazione	22
1.4.2 Split-GFP-based contact site sensor (SPLICS)	24
1.5 Modello sperimentale e dati preliminari	25
Scopo del lavoro	33
Risultati e discussione	37
3.1 Le proteine PERK, CaNA α e eIF2 α sono localizzate nei MERCS nelle cellule HeLa	38
3.2 Nei MERCS i linker modulano la localizzazione di CaNA α e di eIF2 α ma non di PERK in astrociti ippocampali ACN-KO	41
3.3 I MERCS sono alterati dalla delezione di CaNB1: i contatti da 30 nm risultano diminuiti in astrociti ippocampali ACN-KO	46
3.4 Le dinamiche di Ca ²⁺ mitocondriale sono alterate in astrociti ippocampali ACN-KO	48
3.5 Dalle proteine coinvolte nel pathway dell'UPR solo i livelli di ATF4 sono ridotti in astrociti ippocampali ACN-KO	49
3.6 I livelli di proteina IP ₃ R sono ridotti in astrociti ippocampali ACN-KO	51
Conclusioni e sviluppi futuri	56

Materiali e metodi	59
5.1 Colture cellulari	61
5.2 Trasfezione in transiente con plasmidi per l'espressione di ER-RFP, 10nm-EML, 20nm-EML	62
5.3 Lisi cellulare	64
5.4 Saggio BCA (BiChinonic Acid)	64
5.5 SDS-PAGE e Western Blot	65
5.6 Immunofluorescenza	68
5.7 Misurazione del Ca ²⁺ signalling nel mitocondrio	69
5.8 Analisi statistica	70
Bibliografia	72
Ringraziamenti	76

Abbreviazioni

SNC Sistema Nervoso Centrale
GFAP Glial Fibrillar Acid Protein
GLAST Glutamate-Aspartate Transporter
S100B Calcium Binding Protein B
GLT-1 Glutamate Transporter 1
AQ4 Aquaporin 4
Ca²⁺ Calcium
CaN Calcineurin
CaNA Calcineurina Subunit A
CaNB Calcineurin Subunit B
CaM Calmodulin
NFAT Nuclear Factor of Activated T-Cells
NLS Nuclear Localization Sequence
NF- κ B Nuclear Factor Kappa-light-enhancer of activated B cells
TNF α Tumor Necrosis Factor α
IL-1 β Interleuchin-1 β
AP1 Activator Protein 1
FOXP3 Forkhead Box P3
CsA Ciclosporin A
FKBP12 FK506-Binding Protein 12
CCK Cholecystokinin
T-ALL T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia
eIF2 α Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 α
PrP^c Cellular prion Protein
eIF2B Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B
eIF5 Eukaryotic Translation Initiation Factor5
PERK Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
RE Reticolo Endoplasmatico
BiP Binding immunoglobulin Protein
UPR Unfolded Protein Response

ERAD Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation

IRE1 α Inositol-Requiring Enzyme 1 α

ATF6 Activating Transcription Factor 6

ATF4 Activating Transcription Factor 4

XPB1 X-box Binding Protein 1

SP1 Site-1 Proteases

SP2 Site-2 Proteases

MIT mitochondria

MERCS Mitochondria-Endoplasmatic Reticulum Contact Sites

MEF Mouse Embryonic Fibroblast

MCS Membrane Contact Site

OMM Outer Mitochondrial Membrane

IP₃R Inositol Triphosphate Receptor

VDAC Voltage-dependent anion-selective channel

MCU Mitochondrial calcium uniporter

Grp75 Chaperone Glucose-regulated Protein 75

MIMS Mitochondrial Intermembrane Space

IMM Inner Mitochondrial Membrane

MAMs Mitochondria-Associated Membranes

DJ-1 Parkinson's disease related protein

TG2 Transglutaminase 2

TESPA Tymocyte-xpressed Positive Selection-associated Gene 1

S1R Sigma-1 Receptor

WFS1 Wolfram syndrome 1

Mfn 2 Mitofusin 2

TEM Transmission Electron Microscopy

FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer

SPLICS Split-GFP Contact Sites Sensor

TOM20 Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20

GFP Green Fluorescent Protein

UBC6 Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 6
ACN-KO Astroglial CalciNeurin Knock Out
ACN-Ctr Astroglial CalciNeurin Control
RNA-Seq Next Generation RNA sequencing
SG-MS Shotgun Mass Spectrometry Proteomics
WB Western Blot
DAPI 4',6-diamidin-2-fenilindolo
SunSet Surface Sensing of Translation
PLA Proximity Ligation Assay
mRFP monomeric red fluorescent protein
10nm-EML 10nm ER-mitochondria Linker
20nm-EML 20nm ER-mitochondria Linker
SEM Standard Error of Mean
CFTF Corrected Total Cell Fluorescence
ATP Adenosine Triphosphate
ATF5 Activating Transcription Factor 5
Ponceau S Ponceau Staining
iPSC induced Pluripotent Stem Cells
ALS Amyotrophic Lateral Sclerosis
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS Fetal Bovine Serum
HBSS Hanks' Balanced Salt Solution
PLL Poly-L-lysine
AKAP A-Kinase-Anchoring Protein
EDTA Ethylenediaminetetraacetic Acid
PIC Protease Inhibitor Cocktail
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor
PBS Phosphate Buffer Saline
BCA Bicinchoninic Acid
SDS PAGE Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SDS Sodium Dodecyl Sulphate

APS Adenylyl-Sulfate Reductase

TEMED TetraMetilEtilenDiammina

TBS-Tween20 Tris Buffer Saline-Tween20

TBS Trizma Base Solution

PAF Paraformaldehyde

Introduzione

1.1 Gli astrociti

Il Sistema Nervoso Centrale (SNC), costituito da cervello e midollo spinale, comprende differenti tipi cellulari tra cui: neuroni e neuroglia (o glia) (*Encyclopedia of Neuroscience, 2009*)¹. Sebbene il neurone sia l'unità funzionale del SNC, le cellule gliali hanno un ruolo altrettanto importante in quanto coinvolte nel supporto nutrizionale, nel mantenimento dell'omeostasi e nella produzione della guaina mielinica. Protagoniste del mio progetto di tesi sono state un sottotipo di cellule gliali, gli astrociti, cellule morfologicamente e funzionalmente diverse con distribuzione diffusa in tutto il cervello e il midollo spinale.

Gli astrociti affiancano i neuroni in modo contiguo, ordinato e non sovrapposto in tutto il SNC; non esistono regioni in cui non siano presenti. Negli esseri umani, si stima che in alcune regioni del cervello, dal 25% al 50% del volume totale del tessuto sia composto da astrociti (*Gradisnik and Velnar, 2023*)². A partire dal XIX secolo, sulla base delle differenze morfologiche e della localizzazione anatomica, queste cellule sono state divise in due sottotipi principali, protoplasmatici o fibrosi. I primi, presenti in tutta la materia grigia del cervello e della spina dorsale, possiedono una morfologia globoide finemente ramificata, con un numero di rami principali che va da 5 a 10. Gli astrociti fibrosi, invece, tipici della materia bianca del cervello, della spina dorsale e del nervo ottico, sono caratterizzati da processi più lunghi ma meno ramificati. Si stima che nell'ippocampo e nella corteccia molti processi finemente ramificati da un singolo astrocita entrino in contatto con diverse centinaia di dendriti di più neuroni avvolgendone le sinapsi (*Sofroniew and Vinters, 2010*)³.

La caratteristica di riconoscimento ultrastrutturale più importante degli astrociti sono i filamenti intermedi, la cui componente principale è la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), isolata e caratterizzata dal Dr. Eng nel 1969 (*Eng et al, 2000*)⁴. Si tratta di una proteina essenziale per la struttura del citoscheletro delle cellule gliali che consente di etichettare gli astrociti reattivi. Diverse isoforme di GFAP possono essere espresse in modo eterogeneo sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Per questa ragione è ampiamente sfruttata come marcatore specifico per gli astrociti, sensibile e affidabile per l'identificazione immunocitochimica. Fra gli altri marcatori utilizzati in questo ambito si possono includere il trasportatore del glutammato-aspartato GLAST (Glutamate-Aspartate Transporter), la proteina legante il calcio (Ca^{2+}) S100B (calcium-binding protein B), il trasportatore del glutammato GLT-1 (Glutamate Transporter 1) e AQ4 (acquaporina 4), un canale idrico specifico degli astrociti.

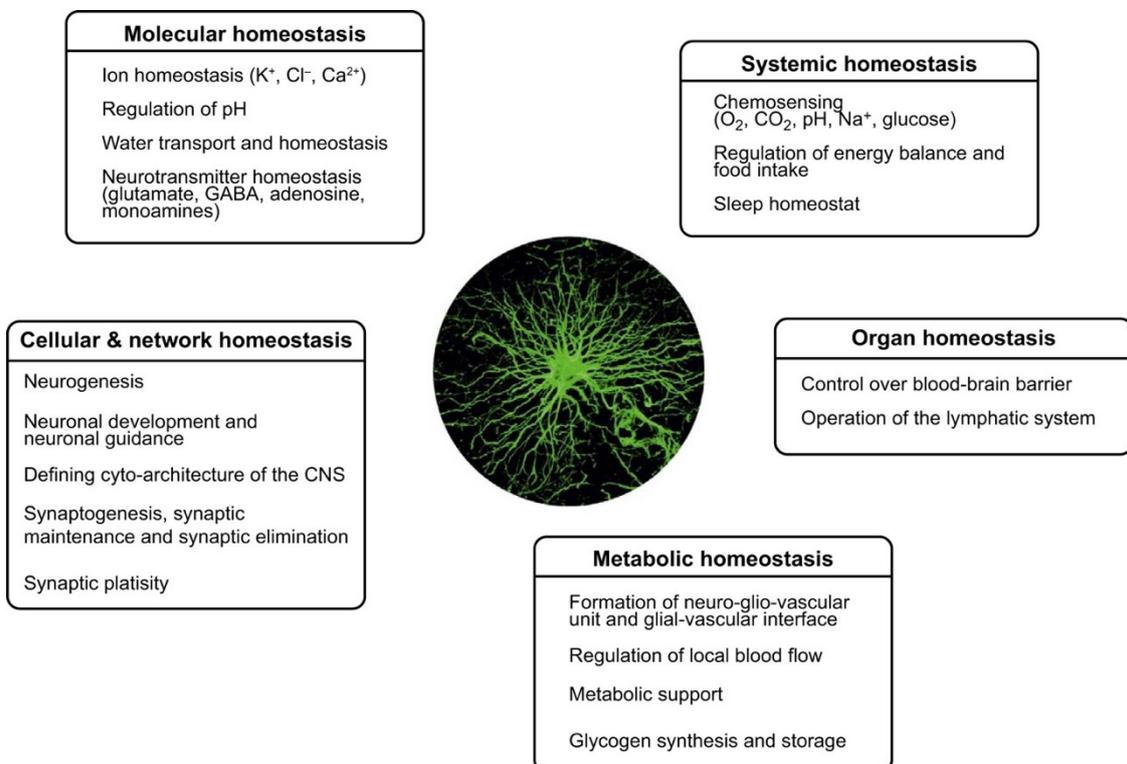
1.1.1 Astrociti: funzioni fisiologiche nel sistema nervoso centrale

Benché si sia a lungo pensato che la funzione degli astrociti fosse limitata solo a compiti strutturali e di supporto, recenti scoperte hanno confermato che gli astrociti svolgono ruoli molto più complessi, specifici e importanti nel SNC, ragion per cui l'interesse per queste cellule è cresciuto notevolmente negli ultimi anni. A seconda della zona e dello stadio dello sviluppo le funzioni omeostatiche svolte dagli astrociti comprendono:

- Supporto metabolico e trofico per i neuroni nelle sinapsi: l'astrocita è, insieme a neurone pre e post-sinaptico, il terzo componente della sinapsi tripartita (*Perea et al, 2009*)⁵. Queste cellule hanno un ruolo modulatore sulla trasmissione sinaptica sia eccitatoria che inibitoria mediante la regolazione di fattori come neurotrasmettitori, ioni e neurotrofine;
- Formazione ed eliminazione delle sinapsi: gli astrociti regolano, mediante il rilascio di alcuni segnali molecolari, la sinaptogenesi e la distruzione delle sinapsi nella materia bianca e grigia (*Allen and Eroglu, 2017*)⁶;
- Ruolo nella migrazione neuronale: formano delle impalcature che guidano la migrazione dei neuroni durante lo sviluppo del SNC (*Gradisnik and Velnar, 2023*)²;
- Formazione di proteine della matrice extracellulare e di molecole di adesione: la principale fonte di produzione di queste molecole sono gli astrociti, i quali possiedono anche recettori di superficie per le proteine della matrice e le molecole di adesione (*Gradisnik and Velnar, 2023*)²;
- Produzione di fattori neurotrofici: gli astrociti fungono da fonte di fattori solubili necessari per il supporto e la sopravvivenza dei neuroni (*Gradisnik and Velnar, 2023*)²;
- Barriera ematoencefalica: contribuiscono alla formazione e al mantenimento della barriera ematoencefalica, fornendo supporto e influenzando il trasporto di molecole fra il sistema vascolare e le cellule gliali (*Cabezas et al, 2104*)⁷ ;
- Angiogenesi: partecipano attivamente a questo processo, inducendo le cellule endoteliali a formare strutture simili ai capillari (*Gradisnik and Velnar, 2023*)²;
- Trasmissione sinaptica: l'eccitabilità neuronale può essere influenzata dal rilascio da parte degli astrociti di molecole simili ai neurotrasmettitori, definite gliotrasmettitori fra cui glutammato e purine (*Nedergaard et al, 2003*)⁸;
- Regolazione del flusso ematico regionale: la gliotrasmissione rappresenta un meccanismo che consente l'adeguamento del flusso ematico poiché quando l'attività sinaptica aumenta, vi è

attivazione degli astrociti e rilascio di sostanza vasoattive (es. ossido di azoto) che stimolano la vasodilatazione (Koehler et al, 2006)⁹;

- Metabolismo energetico e regolazione del microambiente del SNC: sono il principale sito di deposito del glicogeno. I processi degli astrociti sono ben posizionati per assorbire il glucosio dai vasi sanguigni e fornire metaboliti energetici ai neuroni (Beard et al, 2022)¹⁰;
- Detossificazione nello spazio sinaptico: gli astrociti sono coinvolti nell'uptake di neurotrasmettitori eccitatori e inibitori presenti nello spazio sinaptico. Gli astrociti si occupano inoltre dell'eliminazione di ammoniaca e di metalli pesanti, prevenendo il loro accumulo nel SNC (Gradisnik and Velnar, 2023)²;
- Risposta agli insulti: lesioni cerebrali, crisi epilettiche, encefalopatia epatica sono condizioni in grado di provocare l'attivazione ed il rimodellamento morfologico e funzionale degli astrociti (Sidoryk-Wegrzynowicz, 2011)¹¹;
- Ruolo nella risposta immunitaria e nella fagocitosi: fungono da cellule presentanti l'antigene e sono coinvolti nella modulazione delle risposte immunitarie (Giovannoni et Quintana, 2020)¹².



Schema 1.1 Rappresentazione schematica delle numerose funzioni omeostatiche degli astrociti nel SNC sano precedentemente elencate (*Verkhratsky and Nedergaard, 2018*)¹³.

Nonostante i recenti progressi nella comprensione delle funzioni degli astrociti, del loro sviluppo e delle loro relazioni con altre tipologie cellulari, la conoscenza delle loro attività è ancora basilare (*Gradisnik and Velnar, 2023*)². E' certo che un'azione fondamentale per queste cellule è la generazione di segnali di Ca^{2+} in risposta all'attività neuronale, cruciali per adattare la fisiologia astrocitaria alle richieste energetiche e di segnalazione dei neuroni (*Verkhratsky and Nedergaard, 2018*)¹³. La segnalazione del Ca^{2+} astrocitario regola la secrezione di gliotrasmettitori e fattori trofici o nutrienti, è implicato nella modulazione del flusso sanguigno cerebrale e contribuisce a funzioni cerebrali superiori come la formazione della memoria, la respirazione cognitiva e il ciclo sonno-veglia (*Marina et al, 2020*)¹⁴ (*Semyanov et al, 2020*)¹⁵ (*García-Càceres et al, 2019*)¹⁶ (*Santello et al, 2019*)¹⁷. La decodifica dei segnali avviene grazie a proteine calcio-dipendenti fra cui calcineurina (CaN), una serina/treonina fosfatasi (Ca^{2+})-calmodulina dipendente.

1.2 La calcineurina: principale hub citosolico di Ca^{2+} negli astrociti

Identificata nei laboratori di Claude Klee e Philip Cohen alla fine degli anni '70 (*Klee et al, 1979*)¹⁸, CaN è una serina/treonina fosfatasi (Ca^{2+})-calmodulina dipendente.

1.2.1 Struttura, localizzazione e attivazione della calcineurina

Questa proteina ad attività fosfataseica si presenta come un eterodimero, costituito da due subunità, entrambe ben conservate negli eucarioti:

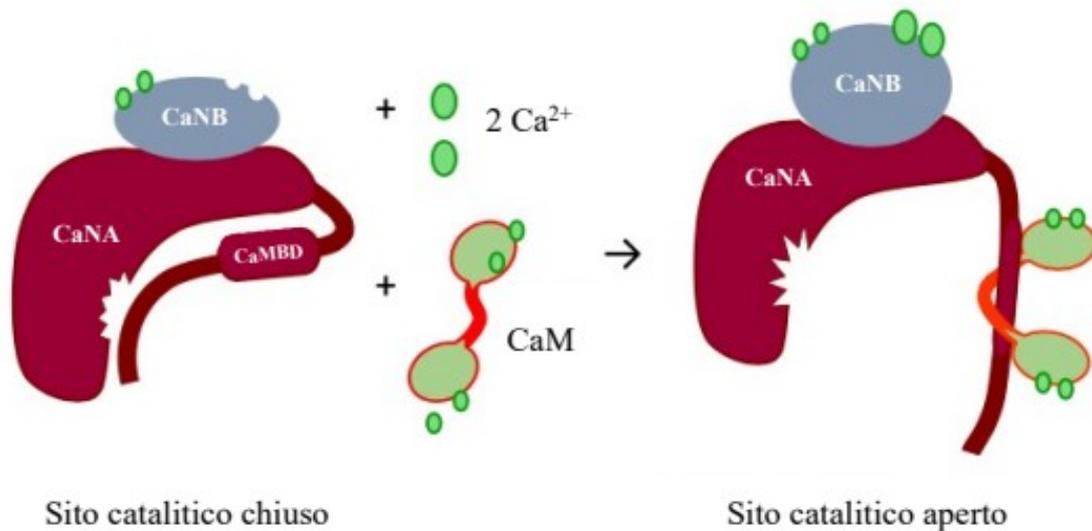
- La subunità catalitica CaNA con dimensioni tra 57 e 59 kDa che contiene il sito attivo dell'enzima all'estremità ammino-terminale e tre domini di legame dotati di funzione regolatoria all'estremità carbossi-terminale: un dominio di legame per la subunità regolatoria (CaNB), un dominio selettivo per il legame con la calmodulina (CaM) e, infine, un dominio auto-inibitorio, il quale, in assenza di Ca^{2+} /calmodulina, forma un' α -elica che si lega al sito attivo e inibisce l'attività enzimatica. Nei mammiferi sono state identificate tre isoforme di CaNA: α , β , γ . Le prime due distribuite ubiquitariamente, mentre l'isoforma γ è espressa in modo specifico nel testicolo (*Muramatsu et al, 1992*)¹⁹.

- La subunità regolatoria CaNB, un peptide di 168 aa contenente quattro motivi EF-hand, che fungono da siti di legame per il Ca^{2+} . Esistono due isoforme di CaNB: CaNB1 (isoforma presente nel cervello dei mammiferi) e CaNB2, codificate da due geni distinti (*Rusnack et al, 2000*)²⁰.

CaN è ampiamente presente nei tessuti dei mammiferi: le subunità A e B sono state osservate nel tessuto adiposo, nelle cellule surrenali, negli osteoclasti ossei, nel fegato, nei linfociti T e B, nelle cellule muscolari; tuttavia i livelli di espressione più alti sono stati riscontrati nel cervello (*Rusnack et al, 2000*)²⁰. Studi condotti fra la metà degli anni '80 e l'inizio degli anni '90 hanno riportato alti livelli di CaN nei neuroni dello striato, dell'ippocampo, dell'amigdala e della neocorteccia, con espressione presente ma ridotta nelle cellule gliali (*Goto et al, 1986*)²¹. Studi successivi hanno dimostrato che, dopo un insulto infiammatorio, essa è osservabile nelle cellule gliali primarie e del tessuto cerebrale intatto (*Vinadé et al, 1997*)²². Negli astrociti CaN è coinvolta nei processi di astrogliosi e neuroinfiammazione, ma è ancora poco conosciuta la sua funzione in condizioni fisiologiche basali (*Lim et al, 2014*)²³, (*Lim et al, 2016*)²⁴, (*Tapella, Soda et al, 2020*)²⁵.

Dal punto di vista subcellulare, numerosi studi hanno dimostrato che questo enzima è localizzato prevalentemente nel citosol (*Kuno et al, 1992*)²⁶, nel nucleo insieme ad altre proteine leganti CaM e, talvolta, anche in associazione a recettori, pompe o canali ionici (*Furman and Norris, 2014*)²⁷.

Poiché l'attivazione di CaN è un fenomeno (Ca^{2+})-dipendente, in condizioni fisiologiche, quando le concentrazioni di Ca^{2+} sono bilanciate, l'enzima è considerato inattivo; in seguito ad un aumento di queste, avviene l'attivazione che si basa su un riarrangiamento strutturale sequenziale in cui il primo passo è rappresentato dal legame di due ioni Ca^{2+} ai due domini EF-hand a bassa affinità nel lobo N-terminale della subunità CaNB. Questo evento induce l'esposizione del sito di legame della CaM che è quindi disponibile per il riconoscimento di quest'ultima, promuovendo lo spostamento del dominio auto-inibitorio dal sito catalitico di CaNA (*Lim et al, 2016*)²⁸. In questo modo, essendo il sito attivo dell'enzima ora libero, CaN può legare le proteine target e defosforilarle.



Schema 1.2 Questa rappresentazione mostra le subunità A (catalitica) e B (regolatoria) di CaN, fosfatasi (Ca^{2+})-calmodulina dipendente. I siti di legame per il Ca^{2+} si trovano sulla subunità regolatoria. In condizioni fisiologiche, l'enzima è inattivo ma, in seguito al legame degli ioni Ca^{2+} e della calmodulina, lo spostamento del dominio auto-inibitorio permette la sua attività fosfataseica.

1.2.2 Calcineurina astrogliale: attività trascrizionale e modulatoria della proteostasi

CaN può interagire con un ampio numero di proteine. Negli anni sono stati caratterizzati numerosi substrati coinvolti in molteplici vie di trasduzione del segnale, evidenziando il ruolo chiave di questo enzima nell'omeostasi cellulare. La maggior parte degli studi condotti sul SNC sono concentrati sul ruolo di CaN in contesti patologici, in particolare nella neuroinfiammazione in cui CaN ha un ruolo cruciale consentendo l'attivazione di pathway trascrizionali, fra cui quelli che coinvolgono i fattori NFAT e NF- κ B.

NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) è membro di una famiglia di cinque fattori trascrizionali espressi in gran parte nelle cellule del sistema immunitario dove furono identificati per la prima volta (Schaw *et al.*, 1988)²⁹, presente anche nelle cellule del sistema nervoso. NFAT, allo stato inattivo, è sequestrato in una forma iper-fosforilata nel citoplasma (Furman and Norris, 2014)²⁷. Viene quindi defosforilato nella porzione N-terminale da CaN attivata, in seguito ad un aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare. In questo modo viene indotto un riarrangiamento strutturale delle proteine che porta all'esposizione delle sequenze di localizzazione nucleare (NLS)

consentendo l'importazione nucleare di NFAT. Una volta nel nucleo, a seconda dei fattori di trascrizione con cui interagisce nel legame al DNA, può determinare una modulazione trascrizionale attivante o repressiva.

Un'altra importante cascata di segnalazione attivata da CaN è quella mediata da NF- κ B, altro fattore di trascrizione con un ruolo consolidato nell'immunità innata e nell'infiammazione. Sebbene l'intera cascata responsabile dell'attivazione di NF- κ B negli astrociti non sia ancora completamente identificata, diversi studi hanno dimostrato che CaN può intervenire in questa via di segnalazione in diversi punti. Un aumento delle concentrazioni di Ca^{2+} induce attivazione di CaN che fosforila I κ B, proteina inibitoria che confina NF- κ B nel citoplasma, in modo che venga indirizzata verso la degradazione da parte del proteasoma e che NF- κ B possa traslocare nel nucleo (*Furman and Norris, 2014*)²⁷. L'ampiezza e la durata dei segnali di Ca^{2+} controllano in modo differenziale l'attivazione di NFAT rispetto a NF- κ B: le oscillazioni a bassa frequenza attivano preferibilmente NF- κ B, le oscillazioni rapide attivano entrambi i fattori di trascrizione (*Crabtree and Olson, 2002*)³⁰.

Negli astrociti, CaN rappresenta un collegamento cruciale fra i cambiamenti morfologici e la segnalazione immunitaria/infiammatoria. In colture primarie di astrociti, molteplici fattori che innescano l'ipertrofia degli astrociti o la neuroinfiammazione, fra cui citochine "pro-infiammatorie" (come fattore di necrosi tumorale α (TNF α), interleuchina 1 β (IL-1 β)), glutammato, ATP, trombina attivano CaN. In condizioni di lesione, invecchiamento e malattie neurodegenerative risultano elevati i livelli di numerosi fattori immunitari/infiammatori la cui espressione è guidata da CaN, una volta che questa è attivata. Il ruolo di CaN come mediatore globale della neuroinfiammazione è associato alle sue azioni di regolazione trascrizionale dipendente da NFAT e NF- κ B in quanto CaN guida i "cicli di citochine" implicati nella neuroinfiammazione cronica. Studi su cellule immunitarie periferiche hanno dimostrato che l'attivazione di CaN può contribuire a processi opposti, ad esempio, produzione di citochine ed espansione clonale in alcune condizioni, e tolleranza e/o anergia dei linfociti in altre condizioni. Una volta traslocata nel nucleo, CaN, associata a fattori di trascrizione, può contribuire a modulare alcune caratteristiche fenotipiche. Ad esempio, l'attivazione delle cellule T è guidata principalmente dalla sinergia di NFAT e della proteina attivatrice 1 (AP1), mentre l'anergia e/o la tolleranza è legata all'interazione fra NFAT e forkhead box P3 (FOXP3), a dimostrare che CaN potrebbe avere effetti non solo "pro-" ma anche "anti-" infiammatori negli astrociti (*Furman and Norris, 2014*)²⁷.

Farmaci in grado di inibire il legame calcineurina-NFAT come tacrolimus (FK506) e ciclosporina A (CsA) possono essere sfruttati come immunosoppressori in quanto, mediante il legame, rispettivamente, con FKBP12 (FK506-binding protein 12) e ciclofillina impediscono la traslocazione di NFAT nel nucleo bloccando così l'azione di CaN. Sono quindi in grado di reprimere in maniera efficace la risposta immunitaria promossa dalle cellule T e di prevenire il rigetto di allotrapianto senza impatto sul flusso di Ca^{2+} (Bendickova, Tidu and Fric, 2017)³¹.

Nelle cellule astrogliali, lo spettro dei partner leganti CaN può cambiare durante la transizione da stati fisiologici a stati patologici (Lim et al, 2023)³². In condizioni di astrogliosi e neuroinfiammazione, la dis-proteostasi causata da un'alterata attività di CaN comporta l'attivazione di NFAT o NF- κ B o altri fattori di trascrizione correlati all'infiammazione a dimostrare la sua capacità di modulare la trascrizione (Schema 1.3 D). Al contrario, nel SNC sano CaN non esercita una significativa regolazione trascrizionale ma la sua attività è richiesta per mantenere la sintesi proteica basale (Schema 1.3 B).

	A	B	C	D
Physiology or pathology stage	Physiology	Physiology	Dysfunction No inflammation	Astrogliosis neuroinflammation
Ca ²⁺ signals	Low or absent	Physiological Ca ²⁺ signaling	Hypothesized Ca ²⁺ & CaM dyshomeostasis; CaNB KO	Chronic Ca ²⁺ overload
CaN state	Inactive	Physiological activity	Hypothesized Dysfunction	Overexpression Overactivation AID cleavage
Hypothesized CaN conformation				
Interacting proteins & Substrates	A, B, C	A, B, C, D, E	B, E, F	D, F, X, Y, Z, NFAT, NF- κ B
Regulation of Transcription	NO	NO	Likely NO	Transcription
Regulation of proteostasis	NA	Proteostasis	Dis-proteostasis	Dis-proteostasis
Phosphatase Activity (%)	~10%	10-100%	< 10-100%	100%

Schema 1.3 Rappresentazione del cambiamento dell'attività di CaN durante la transizione da stati fisiologici a patologici negli astrociti (Lim et al, 2023)³².

Di maggiore rilevanza per il mio progetto di tesi, è il ruolo di CaN nella regolazione della proteostasi cellulare. In diverse sedi, quali ad esempio il tessuto pancreatico, CaN è implicata nel controllo della traduzione, sostanziale per la regolazione della crescita e la produzione degli enzimi digestivi. CaN è il target di farmaci immunosoppressori come FK506 e ciclosporina A: in presenza di elevate concentrazioni di CCK (colecistochinina), ormone secreto dopo i pasti che stimola la sintesi proteica, l'uso degli inibitori FK506 e CsA induce il blocco della crescita pancreatica dimostrando che le proteine regolatrici della traduzione potrebbero essere regolate da CaN (*Sans and Williams, 2004*)³³.

Inoltre, la modulazione dell'attività di CaN in cellule di leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) ha determinato alterazioni nello stato di fosforilazione di molecole chiave implicate nella traduzione proteica come eIF2 α (di cui parlerò in seguito) e la proteina ribosomiale S6 (*Tosello et al, 2016*)³⁴.

CaN gioca un ruolo importante nella modulazione della proteostasi anche negli astrociti. In studi condotti nel laboratorio in cui ho svolto la tesi è stato osservato che l'ablazione genetica o l'inibizione farmacologica di CaN negli astrociti conduce a modulazione dell'espressione di un trasportatore i cui livelli sono alterati in numerose patologie neurologiche, GLAST (Glutamate/Aspartate Transporter), senza, però, alterazione dei suoi livelli di mRNA. Questo ha permesso di dimostrare che la modulazione si verifica a livello post-trascrizionale attraverso la riduzione della sintesi e degradazione proteica (*Dematteis et al, 2020*)³⁵. In uno studio successivo è emerso che, in seguito a trattamento farmacologico o ablazione genetica di CaN, PrP^C (Cellular prion Protein), la cui conversione nell'isoforma patologica causa malattie prioniche, è downregolata negli astrociti. I livelli di espressione della proteina sono ridotti a causa dell'impairment dei meccanismi di traduzione proteica e non di alterazioni della trascrizione (*Dematteis et al, 2022*)³⁶.

CaN interagisce con numerose proteine chiave per la sintesi proteica. Mediante esperimenti di immunoprecipitazione seguiti da spettrometria di massa su cellule T-ALL, è stato osservato che le proteine interagenti con CaN partecipano a diversi pathway di segnalazione, incluso quello di eIF2 (eukaryotic translation Initiation Factor 2), a sottolineare il ruolo che esercita nella traduzione delle proteine (*Tosello et al, 2016*)³⁴. eIF2 è una proteina multimerica (126 kD) composta da tre subunità, α , β e γ , ognuna delle quali presenta una funzione specifica. La subunità α (26 kDa) presenta un residuo di serina-51 che è il target per molecole in grado di regolare l'attività di eIF2 tramite fosforilazione; la subunità β (38 kDa) contiene il sito di legame per altri due fattori: eIF2B (fattore

di scambio nucleotidico della guanina) e eIF5 (GTP-asi attivante la proteina); infine, la subunità γ (52 kDa) lega GTP, GDP e Met-tRNAi (*Bond et al, 2020*)³⁷.

Oltre ad eIF2, fra gli interattori di CaN vi è anche PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase), proteina trans-membrana situata nel reticolo endoplasmatico (RE), caratterizzata da un dominio N-terminale, nel lume del reticolo, dove è presente il sito di legame per BiP (Binding immunoglobulin Protein) che mantiene l'enzima in uno stato inattivo, e un dominio C-terminale dove si trova il dominio chinasi e siti di auto-fosforilazione. L'attivazione di PERK avviene grazie al distacco di BiP, con successiva dimerizzazione e auto-fosforilazione dell'enzima. Una volta attivata, PERK, risulta capace di fosforilare la subunità α di eIF2. La fosforilazione della subunità α di eIF2 permette una riduzione della sintesi proteica generale, strategia che viene sfruttata dalla cellula per contrastare lo stress provocato dall'accumulo di proteine unificate nel RE in un pathway definito UPR (Unfolded Protein Response) (*Bond et al, 2020*)³⁷.

Attraverso esperimenti di pull-down è emerso che CaN interagisce direttamente con PERK in maniera (Ca^{2+})-dipendente e ne promuove l'auto-fosforilazione (*Bollo et al, 2010*)³⁸. Il fatto che CaN interagisca formando un complesso con PERK e eIF2 α , importanti trasduttori di segnale coinvolti nell'UPR, suggerisce sia coinvolta in questo pathway. Ad oggi, tuttavia, le conoscenze della relazione fra CaN e UPR negli astrociti sono limitate, per cui necessitano ulteriore approfondimento.

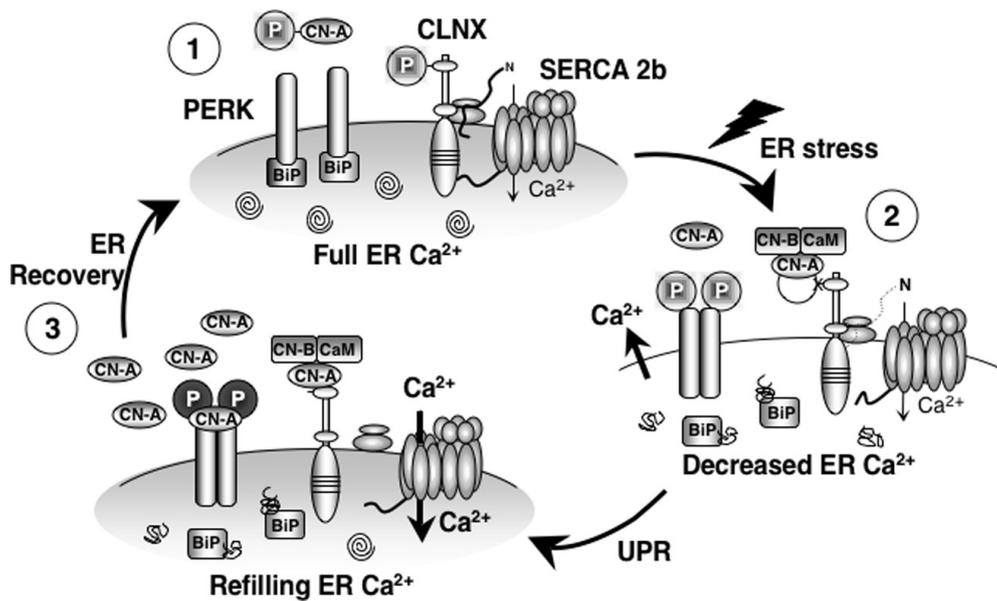
1.3 Il ruolo di CaN nell'UPR e l'interazione con PERK e eIF2 α

CaN è coinvolta nello "stress del RE", un organello fondamentale che immagazzina la maggior parte del Ca^{2+} cellulare, regola la traduzione e la maturazione delle proteine ed è deputato alla sintesi lipidica (in particolare colesterolo e ormoni steroidei). Formato da tubuli e vescicole delimitati da membrana, il RE possiede una regione citosolica e una regione luminale. Questo organello si divide strutturalmente in RE rugoso, responsabile della sintesi, del ripiegamento e delle modifiche post-traduzionali delle proteine secrete e RE liscio, il quale si dedica alla sintesi dei lipidi.

Nonostante la robustezza della complessa macchina che è il RE, un'ampia gamma di disturbi può provocare l'accumulo di proteine unificate o misfoldate all'interno di questo organello, inducendo

stress all'organello. Uno stimolo che può indurre ER stress è l'alterazione dei livelli di Ca^{2+} ; ad esempio una riduzione della $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ causa diminuzione della funzionalità di chaperonine come Grp75 (Chaperone Glucose-regulated Protein 75) e BiP/Grp78 (Binding immunoglobulin Protein/Chaperone Glucose-regulated Protein 78), fondamentali per il corretto folding proteico. Le proteine misfoldate non sono tollerate dalle cellule e provocano l'attivazione di un processo chiamato degradazione associata all'ER (ERAD), grazie al quale queste vengono restituite al citosol per poter essere ubiquitinate e degradate dal proteasoma.

In seguito all'accumulo di proteine unfoldate, un pathway di trasduzione del segnale noto come UPR viene attivato al fine di ripristinare l'omeostasi proteica. Svolgono un ruolo importante tre trasduttori di segnale situati nel RE: PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1 α (Inositol-Requiring Enzyme 1 α) e ATF6 (Activating Transcription Factor 6). In condizioni normali, questi tre sensori sono mantenuti nel loro stato inattivo grazie al legame con lo chaperone BiP. Quando le proteine unfoldate si accumulano nel lume del RE, BiP si dissocia da PERK, IRE1 α e ATF6 portando alla loro attivazione. È stato osservato che la subunità A di CaN promuove l'auto-fosforilazione di PERK, chinasi transmembrana di tipo I che in condizioni di stress inibisce la traduzione proteica generale attraverso la fosforilazione di eIF2 α in modo (Ca^{2+})-dipendente (*Walter and Ron, 2011*)³⁹. Questo evento riduce il carico di proteine che entrano nel RE di una cellula stressata, ma consente anche la traduzione selettiva dell'mRNA che codifica il fattore di trascrizione ATF4, contribuendo così al rafforzamento di una risposta antiossidante, al potenziamento della capacità di ripiegamento del RE e all'induzione dell'apoptosi, in caso di stress cronico.



Schema 1.4 Questo schema riporta il ruolo di CaN nelle diverse fasi dell'UPR. (1) In condizioni di riposo, CLNX è fosforilato, interagisce con SERCA inibendone l'attività, l'autofosforilazione di PERK è impedita da BiP. Il ripiegamento delle proteine avviene in maniera ottimale in queste condizioni. (2) In caso di stress, le proteine unfoldate si accumulano nel lume del RE, BiP si dissocia da PERK che si autofosforila con riduzione della sintesi proteica. A seguito del rilascio Ca²⁺ dal RE, si verifica attivazione di CaN. (3) CaN si associa a PERK, aumentando la fosforilazione di eIF2α e inibizione della sintesi proteica. (1) Ripristino della normale traduzione proteica e dell'omeostasi del RE grazie alla dissociazione di CaN da PERK e al ripristino dei normali livelli di Ca²⁺ (Bollo et al, 2010).

In presenza di proteine unfoldate, IRE1α omodimerizza e si trans-autofosforila permettendo l'attivazione di una RNasi che promuove lo splicing atipico dell'mRNA di XPB1 (X-box Binding Protein 1). Questo induce l'attivazione del fattore di trascrizione sXPB1 in grado di regolare l'espressione di geni coinvolti nell'ERAD (Malhotra and Kaufman, 2007)⁴⁰.

ATF6 è una proteina transmembrana del RE che, in seguito ad attivazione in caso di ER stress, trasloca nell'apparato di Golgi dove viene scissa dalle proteasi SP1 e SP2 (Site-1 and Site-2 Proteases). Il frammento citosolico N-terminale di ATF6 si comporta come un fattore di trascrizione, perciò trasloca nel nucleo e induce la sovraregolazione di un set selezionato di geni coinvolti nell'UPR, inclusi quelli che rinforzano il pathway ERAD (Hez and Papa, 2017)⁴¹, (Hillary and FitzGerald, 2018)⁴².

Durante i processi di attivazione del pathway UPR si osserva un'aumentata espressione di PERK in particolari regioni di contatto tra RE e mitocondrio (MIT), noti come MERCS (Mitochondria-ER

Contact Sites), di cui discuterò a seguire. Alterazioni nel signalling del Ca^{2+} , una differente morfologia del RE e contatti più deboli fra i due organelli in cellule MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) KO per PERK hanno consentito di dimostrare che questa proteina ha un ruolo di legame fondamentale all'interfaccia RE-MIT (*Verfaillie et al, 2012*)⁴³. Dagli studi precedentemente citati emerge che PERK e CaN possano coordinarsi per il controllo della proteostasi ma se la regolazione di questa negli astrociti possa avvenire grazie al coordinamento di CaN, PERK e eIF2 α a livello dei MERCS non è ancora noto.

1.4 I siti di contatto fra reticolo endoplasmatico e mitocondrio

Al fine di coordinare le attività cellulari, gli organelli stabiliscono fra di loro dei contatti denominati siti di contatto di membrana (Membrane Contact Sites, MCS) i quali, stabilizzati da strutture di ancoraggio, creano microdomini che consentono lo scambio di segnali o metaboliti tra i diversi compartimenti. Il RE prende parte a un'ampia rete cellulare creando dei contatti con la membrana plasmatica, i mitocondri, il Golgi, i lisosomi e altri organelli cellulari. Di fondamentale rilevanza per diverse funzioni cellulari come biosintesi lipidica, autofagia, apoptosi, infiammazione e regolazione dello scambio inter-organellare del Ca^{2+} sono i contatti che il RE stabilisce con il mitocondrio, definiti MERCS. Si tratta di unità morfo-funzionali formate nei punti di stretta apposizione dell'endomembrana del RE e della membrana mitocondriale esterna (OMM).

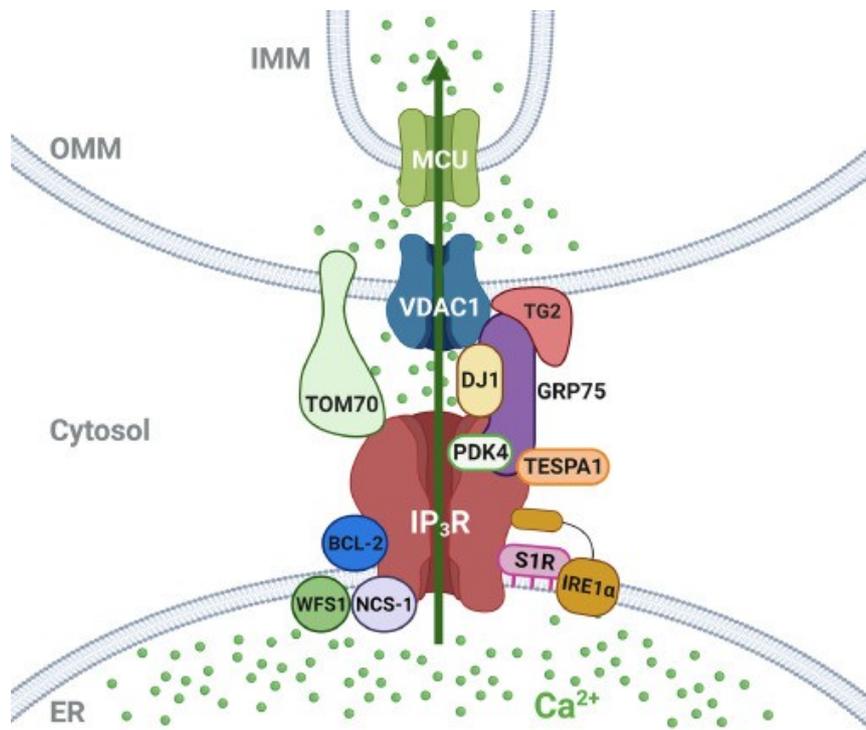
La composizione proteica dei MERCS e la distanza tra la OMM e il RE è fondamentale per il corretto trasferimento del Ca^{2+} fra RE e mitocondrio. È stato osservato che questi parametri sono alterati in diverse patologie quali diabete, tumore, patologie cardiache e muscolari e malattie neurodegenerative (*Doghman-Bouguerra and Lalli, 2019*).

In corrispondenza dei MERCS, ha luogo il trasferimento di Ca^{2+} dal RE al mitocondrio grazie ad un complesso proteico composto dal recettore dell'inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3R) posto sul RE, un canale anionico voltaggio dipendente (VDAC) situato sulla OMM, l'uniporter del Ca^{2+} mitocondriale (MCU) sulla membrana mitocondriale interna (IMM) e la proteina regolata dal glucosio 75 (Grp75).

IP_3R consente il trasferimento di Ca^{2+} dal RE al mitocondrio. Durante il trasferimento di Ca^{2+} dal lume del RE al mitocondrio, IP_3R collabora e interagisce con VDAC. L'interazione molecolare fra

VDAC e IP₃R è mediata da uno chaperone del RE, Grp75 (Lim et al, 2021)⁴⁴. Silenziando il gene che codifica per questa proteina, è stato dimostrato che risulta completamente abolita l'interazione funzionale fra IP₃R e VDAC a dimostrazione dell'importanza di questo chaperone (Szabadkai et al, 2006)⁴⁵. VDAC permette il passaggio dello ione Ca²⁺ nello spazio fra le due membrane del mitocondrio, detto MIMS (Mitochondria Intermembrane Space). In seguito, il trasferimento di Ca²⁺ nella matrice mitocondriale si verifica attraverso MCU e la differenza potenziale esistente nella IMM. Nonostante MCU abbia bassa affinità per il Ca²⁺ (K_d 10-20 μM) e che quindi in condizioni di riposo il trasferimento di Ca²⁺ avvenga a bassa velocità, grazie alla connessione RE-MIT, garantita dal complesso IP₃R-VDAC, la velocità aumenta consentendo di soddisfare i bisogni energetici della cellula. Al contrario, un eccessivo trasferimento di Ca²⁺ dal RE al mitocondrio rappresenta un segnale pro-apoptotico.

Per diverso tempo è rimasta sconosciuta la ragione per cui i mitocondri mostrino una [Ca²⁺]_{mit} molto elevata dopo il rilascio di Ca²⁺ nel RE (Rizzuto et al, 1992)⁴⁶, finché nel 1998 sono stati individuati i MERCS, microdomini in cui [Ca²⁺] è 10 volte superiore a quella citosolica.



Schema 1.5 Rappresentazione del complesso macchinario di trasferimento del Ca²⁺ nei MERCS. Fra i componenti principali vi sono il recettore dell'inositolo-1,4,5-trifosfato (IP₃R) situato sulla membrana del RE, il canale anionico voltaggio-dipendente (VDAC)

localizzato sulla membrana mitocondriale esterna (OMM) e la proteina regolata dal glucosio (Grp75). Questo complesso, insieme a MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter), costituisce l'asse di trasferimento del Ca^{2+} . Diversi fattori interagiscono con i componenti del complesso al fine di garantire la formazione e la stabilità dei MAMs (Mitochondria-Associated Membranes): Parkinson's disease related protein DJ-1, transglutaminase 2 TG2, TOM70, tmyocyte-expressed positive selection-associated gene 1 TESPA, PDK4, IRE1 α , sigma-1 receptor (S1R), BCL-2 e Wolfram syndrome 1 WFS1 (Ridder et al, 2023)⁴⁷.

In condizioni fisiologiche, questo meccanismo molecolare regola i flussi di Ca^{2+} RE-MIT, essenziali per molti processi Ca^{2+} -sensibili tra cui la bioenergetica del MIT, l'UPR e l'apoptosi (Rowland et al, 2012)⁴⁸.

1.4.1 L'influenza della distanza tra reticolo endoplasmatico e mitocondrio ed i metodi per la sua misurazione

Affinché sia conservata l'integrità dei MERCs e che avvenga un corretto signalling del Ca^{2+} , risulta di fondamentale rilevanza la distanza fisica RE-MIT.

In condizioni fisiologiche la distanza fra RE e OMM è compresa fra ≤ 5 e 80 nm. Un'alterazione dell'architettura dei contatti può alterare il signalling del Ca^{2+} e di conseguenza la risposta cellulare. Diversi studi sperimentali hanno mostrato che la distanza ideale per il corretto trasferimento dello ione fra i due organelli è compresa tra 15 e 20 nm (Csordàs et al, 2006)⁴⁹.

I parametri fisici da considerare per analizzare l'interazione includono la distanza trasversale tra la membrana del RE e la membrana mitocondriale esterna (OMM) e l'estensione dell'interfaccia RE-OMM: se aumenta la distanza trasversale o diminuisce la lunghezza dell'interfaccia RE-OMM vi è un indebolimento dell'interazione fra i due organelli. Al contrario se diminuisce la distanza trasversale oppure aumenta l'estensione dell'interfaccia si verifica un rafforzamento dell'interazione. Infine, l'aumento del numero di contatti fra i due organelli è indicativo di una migliore interazione RE-MIT (Lim et al, 2016)⁴⁴.

La distanza fra RE e OMM può variare nelle diverse condizioni fisiopatologiche; nelle prime fasi dell'ER-stress, al fine di aiutare la cellula a superare questa fase di emergenza, aumenta il numero dei contatti e il trasferimento di Ca^{2+} (Marchi et al, 2017)⁵⁰. Nelle cellule di mammifero moltissime proteine strutturali garantiscono la prossimità RE-mitocondrio, fra cui Mfn 2 (Mitofusin 2), una

GTPasi dinamina-simile che risiede sia su OMM che su RE e che funziona da regolatore centrale della prossimità dei contatti e dei flussi di Ca^{2+} fra i due organelli.

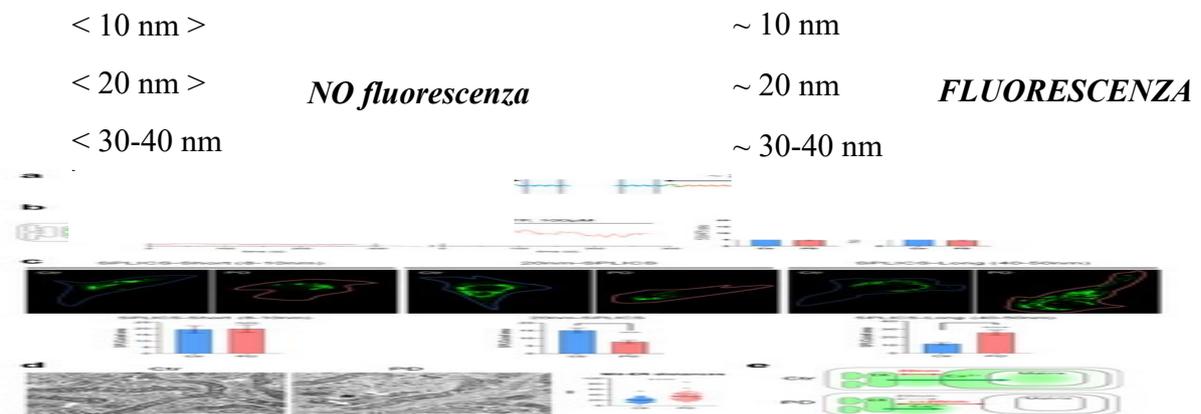
Obesità, diabete di tipo II, malattie neurodegenerative come morbo di Parkinson e malattia di Alzheimer sono patologie correlate alla compromissione dei siti di contatto RE-MIT, a dimostrazione dell'importanza cruciale dell'interazione fra i due organelli per il destino della cellula (Marchi et al, 2017)⁵⁰.

Per valutare l'interazione e misurare la distanza fisica fra organelli intracellulari diverse tecniche sono disponibili, ciascuna con i propri limiti: microscopia elettronica a trasmissione (TEM), co-trasduzione con proteine fluorescenti con proprietà spettrali differenziali (co-FP) dirette al RE e ai mitocondri e metodi basati sulla fluorescenza con sensori split-GFP (SPLICS, split-GFP contact sites sensors) o FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Il TEM è il metodo più accurato per l'analisi morfologica, consente la misurazione sia della distanza trasversale che dell'estensione dell'interfaccia ma, dal momento che i campioni devono essere fissati, non permette l'imaging *in vivo* e l'analisi dinamica dei MERCS. Il co-FP consente di rivelare la co-localizzazione o sovrapposizione dei segnali fluorescenti ma ha ampie limitazioni in termini di risoluzione. Recentemente è stata sviluppata una strategia che ha permesso di sviluppare dei sensori dei siti di contatto fra gli organelli, noti come Split-GFP-based contact site sensor (SPLICS) che ho utilizzato per lo studio dei contatti negli astrociti durante gli esperimenti svolti per la stesura della mia tesi (Cieri et al, 2018)⁵¹.

1.4.2 Split-GFP-based contact site sensor (SPLICS)

Per valutare la distanza RE-MIT sono stati messi a punto gli SPLICS, sensori ingegnerizzati per generare fluorescenza quando gli organelli sono in prossimità. Tre varianti di sensori sono state create: SPLICS-short, in grado di rilevare interazioni a una distanza di 8-10 nm, SPLIC-20, capaci di riconoscere una distanza di 20 nm e SPLICS-long per il rilevamento di distanze maggiori, 30-40 nm (Vallese et al, 2020)⁵². Questi sensori sono caratterizzati dalla presenza di due frammenti di lettura indipendenti dei quali uno è diretto alla OMM e l'altro alla membrana del RE. Il frammento che riconosce la OMM appartiene alla proteina TOM20 (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20) ed è marcato con la porzione GFP1-10, i primi 10 foglietti β della GFP. Il frammento diretto alla membrana del RE, invece, appartiene alla proteina UBC6 (Ubiquitin

Coniugating Enzyme E2 6) legata all'ultimo foglietto β della GFP (β 11). Entrambi i frammenti sono fusi con uno spacer rigido a α elica. In questo modo, solamente quando le membrane che esprimono i frammenti ER-GFP1-10 e OMM- β 11 sono a una distanza precisa, la proteina ricostituita genera fluorescenza (Cieri et al, 2018)⁵¹.



Schema 1.6 Illustrazione del design degli SPLICS. Sono stati utilizzate tre varianti: SPLICS-short in grado di rilevare distanze di 10nm, SPLICS-20 in grado di rilevare distanze di 20nm e SPLICS-long per il rilevamento di distanze maggiori, pari a 30-40nm. Quando RE e MIT si trovano a distanze maggiori o minori di quelle sopra indicate, la GFP (Green Fluorescent Protein) non genera fluorescenza. Quando nelle cellule trasfettate con SPLICS-short, SPLICS-20 e SPLICS-long i due organelli si trovano ad una distanza rispettivamente di circa 10nm, 20nm e 30-40nm la fluorescenza viene generata.

I vantaggi degli SPLICS comprendono la facilità d'uso, la possibilità di eseguire un'analisi dinamica dei MERCs, la compatibilità con cellule vive permettendo di ricavare informazioni quantitative precise sulla distanza.

1.5 Modello sperimentale e dati preliminari

Al fine di chiarire quali siano i meccanismi alla base delle risposte omeostatiche dipendenti dai segnali di Ca^{2+} negli astrociti, nel laboratorio in cui ho svolto la tesi sono stati generati dei modelli murini mancanti della subunità regolatoria B1 di CaN solo nelle cellule astrogliali, attraverso il sistema Cre/LoXP. Questo modello è stato chiamato Astroglial CalciNeurin KO (ACN-KO) e

confrontato ad un modello privo del KO, definito Astroglial CalciNeurin Ctr (ACN-Ctr) (Tapella, Soda et al, 2020)²⁵.

I topi sono stati generati attraverso l'incrocio di topi CaNB1^{flox/flox} in cui il III, IV e V esone del gene CaNB1 sono stati fiancheggiati da sequenze LoXP (Neilson et al, 2004)⁵³ (Jackson Laboratory; 129S-Ppp3r1tm2Grc/J) e topi in cui l'espressione della ricombinasi Cre batterica (Causes Recombination) è controllata dal promotore GFAP (Gregorian et al., 2009)⁵⁴ (Jackson Laboratory; Cg-Tg(Gfap-cre)77.6Mvs/2J). I topi fondatori sono stati reincrociati per quattro generazioni e la linea è stata mantenuta incrociando topi maschi CaNB1^{flox/flox}/GfapCre^{-/-} (Astroglial CalciNeurin Control, ACN-Ctr) con femmine CaNB1^{flox/flox}/GfapCre^{+/-} (Astroglial CalciNeurin Knock-Out, ACN-KO) (Tapella, Soda et al., 2020)²⁵.

In questo modo, grazie alla ricombinasi Cre batterica che agisce attraverso il taglio, lo scambio e il legame di DNA fra due siti LoxP, vengono deleti gli esoni menzionati della subunità regolatoria della calcineurina B1. Essendo la ricombinasi sotto il controllo del promotore GFAP, marker astrogliale, questo avviene solo negli astrociti, la maggior parte dei quali è noto siano GFAP-positivi nel cervelletto e nell'ippocampo (Verkhatsky & Nedergaard, 2018)⁵⁵.

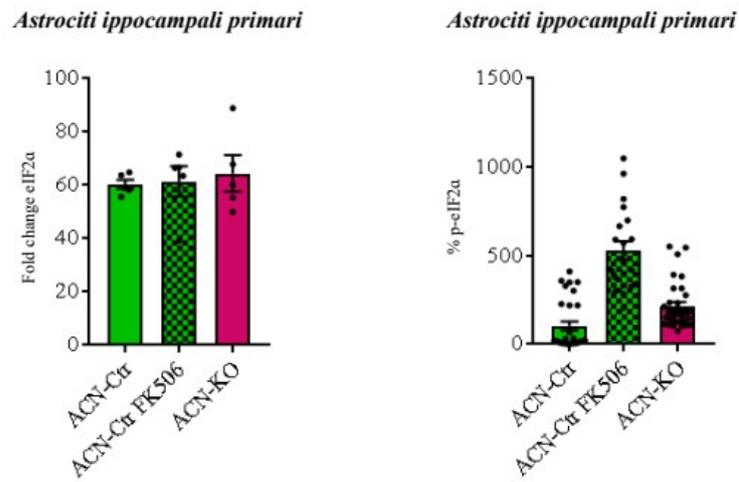
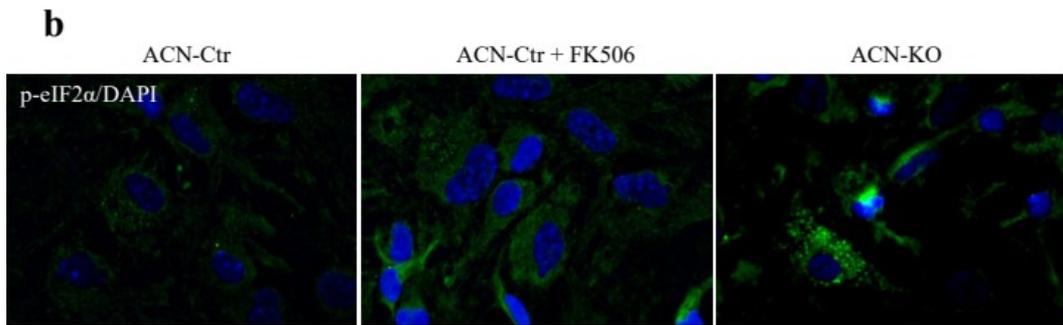
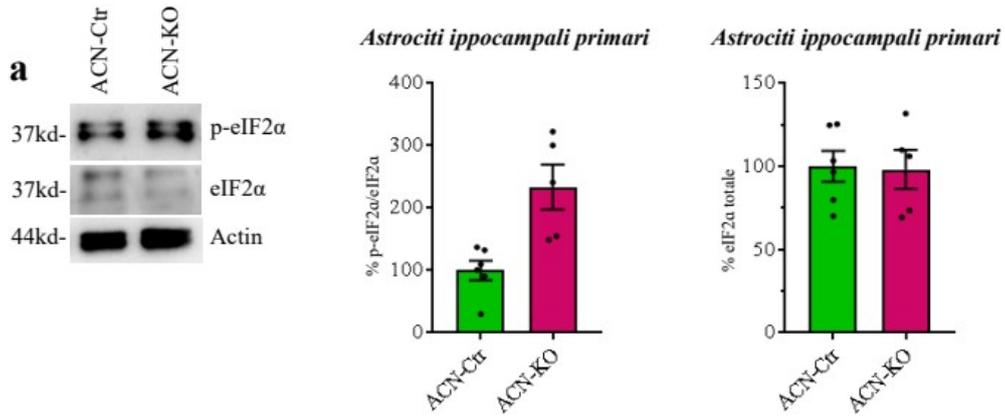


Schema 1.7 Rappresentazione schematica del modello murino ACN-KO utilizzato negli esperimenti. Grazie al sistema Cre/LoXP è stato possibile creare il modello ACN-KO che non esprime la subunità regolatoria di CaN (CaNB1) ma esprime solo la subunità catalitica CaNA. Il modello utilizzato come controllo (ACN-Ctr), invece, esprime entrambe le subunità.

Lo studio di questo modello ha mostrato che la delezione di CaNB1 negli astrociti genera un'alterazione dell'eccitabilità neuronale nelle cellule granulari cerebellari e nei neuroni piramidali ippocampali già ad un mese di vita (Tapella, Soda et al, 2020)²⁵. Sono state condotte analisi di Next Generation RNA sequencing (RNA-Seq) e shotgun mass spectrometry proteomics (SG-MS) su topi

ACN-Ctr (esprimenti sia CaNA α sia CaNB1) e ACN-KO (esprimenti solo CaNA α), da cui è emerso che la delezione di CaNB1 astrogliale non causa alterazioni di tipo trascrizionale nell'ippocampo e nel cervelletto. Al contrario e sorprendentemente risulta essere modificata l'espressione proteica (Tapella, Dematteis et al, 2021)⁵⁶. Infatti, dall'analisi proteomica e dalla regolazione dell'espressione e localizzazione di alcune specifiche proteine differenzialmente espresse in proteomica, negli astrociti ACN-KO è stato ipotizzato che CaN possa avere un ruolo nella sintesi e degradazione di proteine come GLAST (Dematteis et al, 2020)³⁵ e PrP (Dematteis et al, 2022)³⁶. Dallo studio dei pathway proteici differenzialmente espressi dai due genotipi nell'analisi proteomica è emerso un forte coinvolgimento nei pathway del RE e nella sintesi proteica (Dematteis et al, 2020)⁵⁷, suggerendo che CaN possa influenzare la traduzione proteica anche negli astrociti.

Ulteriori esperimenti condotti nel laboratorio in cui ho svolto la tesi hanno evidenziato che la delezione di CaNB1 o la sua inibizione, attraverso trattamento con inibitore FK506, specifico per gli astrociti, aumenta la fosforilazione di p-eIF2 α *in vitro* (Figura 1.1 a, b a seguire) e *in vivo* (Figura 1.1 c a seguire) e, di conseguenza, riduce la sintesi proteica *in vitro* (Figura 1.2 a a seguire) e su colture di astrociti ippocampali ACN-Ctr vs ACN-KO (Figura 1.2 b a seguire).



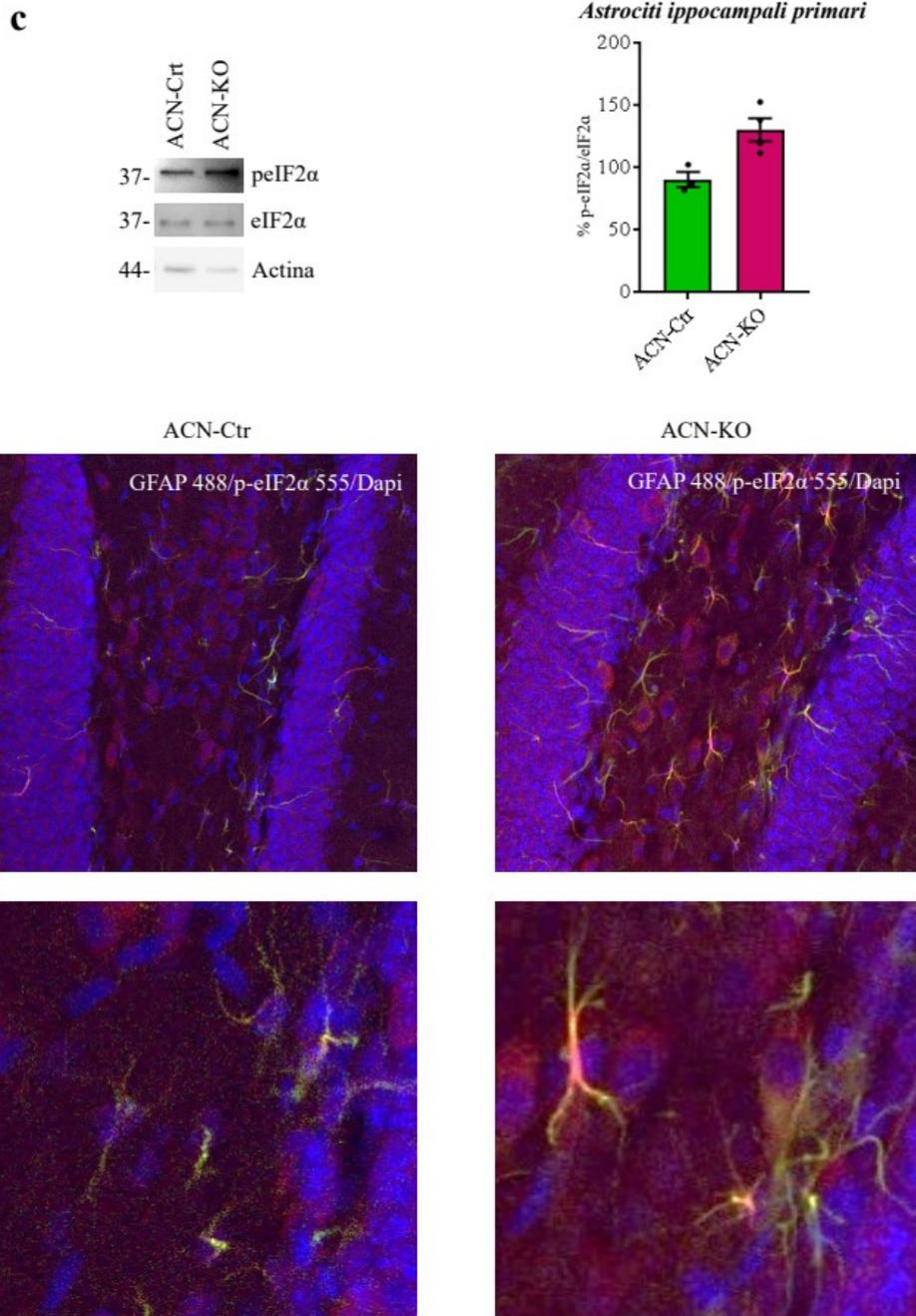
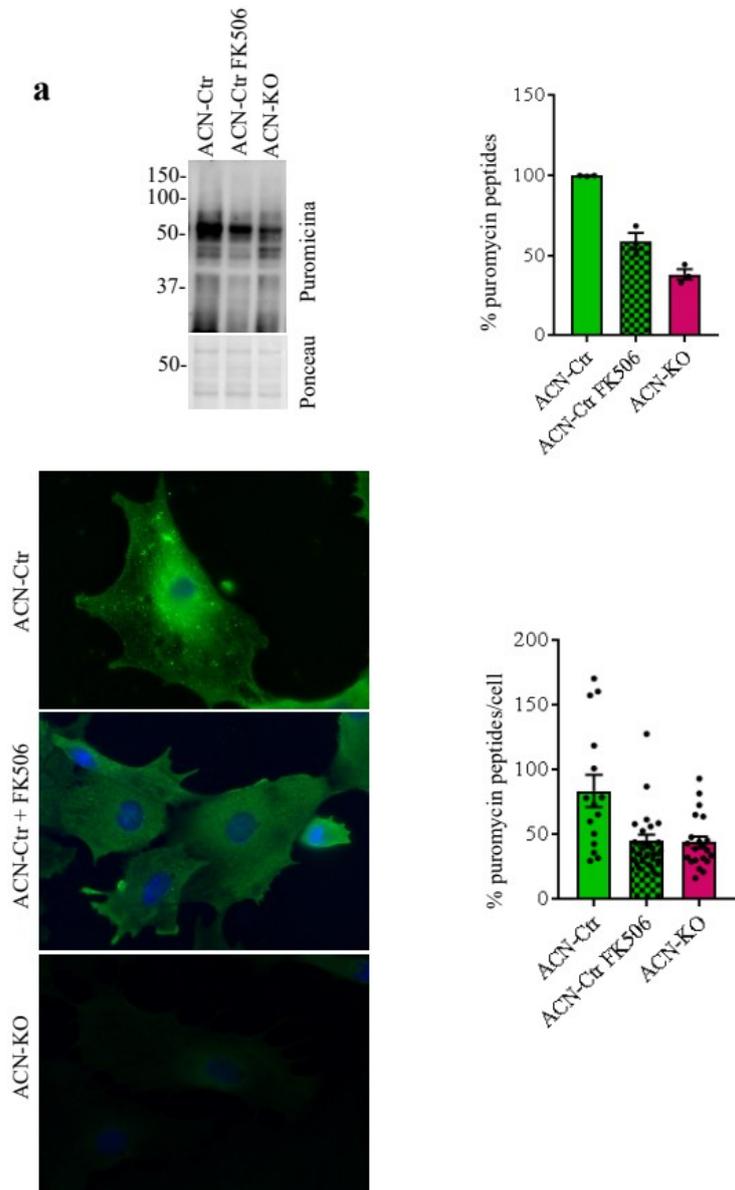


Figura 1.1 Analisi dei livelli di fosforilazione di eIF2 α (p-eIF2 α) e di eIF2 α totale e valutazione del livello di espressione della proteina totale e del trascritto *in vitro* e *in vivo*. Analisi dei livelli di espressione di p-eIF2 α e di eIF2 α totale con WB su lisato totale da coltura primaria ippocampale di astrociiti da topi ACN-Ctr e ACN-KO e relativa analisi densitometrica normalizzata su actina (Figura a). Analisi di immunofluorescenza per p-eIF2 α eseguita su astrociiti ACN-Ctr, ACN-Ctr trattato con inibitore di calcineurina (FK506) e ACN-KO. È stato utilizzato un anticorpo anti-p-eIF2 α , in verde, mentre per i nuclei è stata usata una colorazione con DAPI, in blu (Figura b). Analisi di immunistoichimica su sezioni ippocampali di topi ACN-Ctr e ACN-KO. È stato utilizzato un anticorpo anti-p-eIF2 α , in verde, mentre per i nuclei è stata usata una colorazione con DAPI, in blu (Figura c).



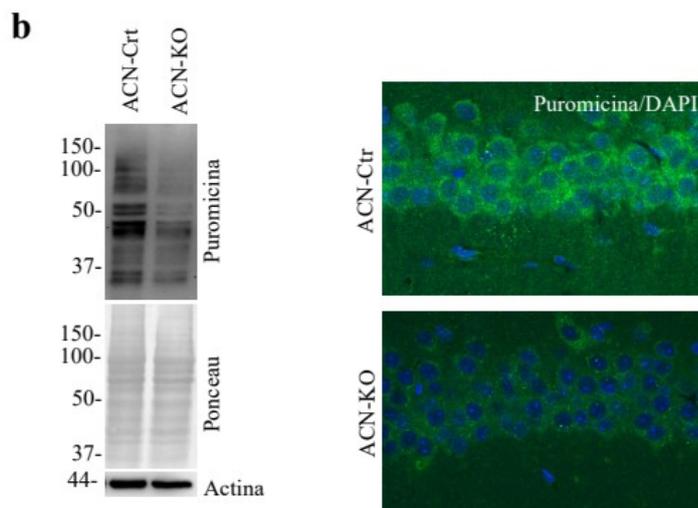


Figura 1.2 Valutazione della sintesi proteica attraverso l'utilizzo del metodo SunSet (Surface Sensing of Translation) *in vitro* su colture di astrociti ippocampali di topi ACN-Ctr, ACN-Ctr trattato con inibitore di calcineurina (FK506) e ACN-KO (figura a) e *in vivo* in ippocampo di topi ACN-Ctr e ACN-KO mediante WB e immunofluorescenza.

Esperimenti di immunoprecipitazione su lisati di astrociti ippocampali ACN-Ctr, ACN-Ctr trattato con FK506 e ACN-KO ed astrociti umani (hAstro) hanno poi consentito di dimostrare che CaN e eIF2 α stabiliscono un'interazione e formano un complesso a livello astrocitario, insieme con la proteina PERK (Figura 1.3). L'interazione tra eIF2 α e CaN è stata dimostrata anche grazie al saggio PLA (Proximity Ligation Assay) in astrociti ippocampali murini (non mostrato). L'analisi degli ippocampi dai due genotipi ha confermato l'aumento della fosforilazione di eIF2 α (Figura 1.1) e la diminuzione della sintesi proteica *in vivo* (Figura 1.2), ma non l'attivazione dell'UPR PERK-dipendente nell'ippocampo dei topi KO. Tali esperimenti hanno evidenziato che il complesso CaN-eIF2 α -PERK si forma negli astrociti, ma se questo complesso si forma nei MERCs, sia coinvolto nell'UPR o influenzi direttamente o indirettamente il trasferimento di Ca²⁺ da RE a mitocondrio non è ancora noto.

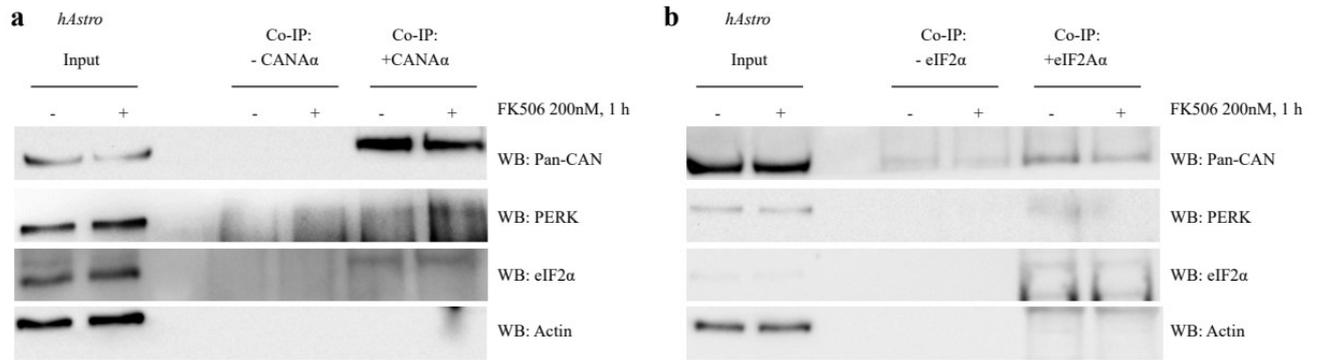


Figura 1.3 Analisi di immunoprecipitazione, condotta sia in presenza (Co-IP +CaNA α e Co-IP+eIF2 α) che in assenza di anticorpo (Co-IP -CaNA α e Co-IP -eIF2 α) su lisati di astrociti ippocampali umani Ctr e trattati con inibitore di calcineurina FK506 (200nM per 1 ora). Analisi dell'espressione delle proteine del complesso CaNA α , PERK e eIF2 α con WB su immunoprecipitati ottenuti da lisati di astrociti ippocampali Ctr e trattati con FK506.

Scopo del lavoro

La calcineurina ha un ruolo chiave in neurotrasmissione, formazione della memoria, trasmissione sinaptica e plasticità. CaN è presente non solo nei neuroni, sede principale di espressione, ma anche negli astrociti dove, in condizioni patologiche, partecipa a meccanismi quali neuroinfiammazione e gliosi reattiva. Oltre a tali funzioni è noto che possa avere un ruolo nella regolazione della proteostasi cellulare. Grazie allo studio del modello ACN-KO (esprime solo la subunità CaNA α) è stato dimostrato che la delezione di CaNB1 astrogliale possa indurre un'alterazione dell'eccitabilità nelle cellule granulari cerebellari e nei neuroni piramidali ippocampali (Tapella, Soda et al, 2020)²⁵. Ciò suggerisce che la delezione di CaNB1 impatti massivamente sulla funzione fisiologica basale sia degli astrociti sia dei neuroni. Inoltre, l'analisi proteomica e trascrittomica e dati non pubblicati su questo modello hanno consentito di mettere in luce il fatto che CaNB1 negli astrociti ha un effetto sulla regolazione dei pathway dipendenti dal RE e della sintesi proteica (Dematteis et al, 2020)⁵⁷. Infine, è emerso che CaN possa, in condizioni basali, formare un complesso con due proteine chiave dell'UPR (PERK e eIF2 α) per regolare i livelli basali di traduzione negli astrociti (Bollo et al, 2010)³⁸ (Tosello et al, 2016)³⁴ (Tapella, Soda et al, 2020)²⁵. PERK è residente nei siti di contatto tra RE e mitocondrio (MERCs), la cui integrità è fondamentale per la fisiologia di entrambi gli organelli e per il destino cellulare.

Sulla base di questi dati preliminari l'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare la relazione di dipendenza tra le proteine formanti il complesso CANA α -PERK-eIF2 α e i MERCs.

In particolare, è stato analizzato:

1. Se il complesso costituito da CaNA α , PERK e eIF2 α fosse ugualmente localizzato nei MERCs negli astrociti primari ACN-KO (esprime solo CaNA α) e ACN-Ctr (esprime sia CaNA α che CaNB1);
2. Se la delezione di CaNB1 influenzasse la corretta formazione dei MERCs;
3. Se la delezione di CaNB1 modulasse il pathway dell'UPR e il toolkit del Ca²⁺ negli astrociti primari ACN-KO e ACN-Ctr

Tali analisi risultano importanti per capire i meccanismi basali di risposta Ca²⁺/calcineurina dipendenti negli astrociti che ad oggi richiedono ampio interesse da parte dei ricercatori per la successiva comprensione dei processi patologici correlati.

Risultati e discussione

3.1 Le proteine PERK, CaNA α e eIF2 α sono localizzate nei MERCS nelle cellule HeLa

Per valutare se le proteine PERK, CaNA α e eIF2 α , coinvolte nel complesso descritto negli astrociti, siano localizzate nei MERCS sono state inizialmente sfruttate cellule HeLa, cellule immortalizzate derivanti da un carcinoma della cervice uterina, largamente utilizzate come modello di studio di espressione e localizzazione di proteine. HeLa stabilmente esprimenti RFP, 10nm-EML, 20nm-EML sono state precedentemente generate nel laboratorio in cui ho svolto la tesi e utilizzate per verificare la presenza o l'assenza delle proteine coinvolte nel complesso in MERCS a specifiche distanze, 10 nm o 20 nm, dei MERCS attraverso analisi di co-localizzazione della proteina RFP e le proteine formanti il complesso. Questi linker sono stati precedentemente convalidati (dati non mostrati) mediante microscopia elettronica; la loro capacità di imporre la distanza definita è stata confermata (Dematteis *et al*, 2024)⁵⁸.

Le HeLa sono state fissate ed è stata condotta un'analisi di immunofluorescenza sfruttando anticorpi primari anti-PERK, anti-CaNA α e anti-eIF2 α (in verde). La colorazione dei nuclei è stata effettuata tramite colorazione con DAPI (in blu). Mediante analisi di microscopia confocale, è stata valutata la co-localizzazione tra le proteine e i linker mediante il coefficiente di Pearson. Tale coefficiente è un numero compreso fra -1 e 1 che misura la forza e la direzione della relazione fra due variabili, in questo caso fra il segnale verde delle proteine e il segnale rosso di mRFP dei linker o del Ctr. Il valore del coefficiente di Pearson è stato ottenuto utilizzando il software Fiji ImageJ 1.52p e con il plugin JacoP, il quale effettua una valutazione della sovrapposizione di due segnali.

Dalle analisi è stato osservato che PERK localizza nel RE, come atteso. Osservando le figure 3.1 a, b, si può notare che nelle cellule HeLa esprimenti i linker (10nm-EML e 20nm-EML) vi è un aumento della percentuale del coefficiente di Pearson che indica che vi è una maggiore co-localizzazione fra il segnale verde di PERK e il segnale rosso di mRFP. L'aumento osservato nelle cellule HeLa 10nm-EML e 20nm-EML risulta essere statisticamente significativo mediante T-test ($p\text{ value}<0.05$) rispetto alla condizione di controllo, HeLa ER-RFP (Figura 3.1 b).

Sfruttando lo stesso tipo di analisi è stata valutata la co-localizzazione di CaNA α con 10 e 20nm-EML; anche in questo caso emerge un aumento della percentuale del coefficiente di Pearson a indicare una maggiore co-localizzazione della proteina in corrispondenza dei linker, come si può osservare dalle immagini acquisite con microscopio confocale (Figura 3.1 c). L'aumento osservato nelle cellule HeLa 10nm-EML e 20nm-EML risulta essere statisticamente significativo mediante T-test ($p\text{ value}<0.05$) rispetto alla condizione di controllo, HeLa ER-RFP (Figura 3.1 d). Un risultato opposto è emerso per la proteina eIF2 α , come si può osservare dalle figure 3.1 e, f. Nelle cellule

HeLa 10nm-EML e 20nm-EML la co-localizzazione della proteina con il linker risulta ridotta in modo statisticamente significativo mediante T-test ($p \text{ value} < 0.05$) rispetto alla condizione di controllo, HeLa ER-RFP (Figura 3.1 f).

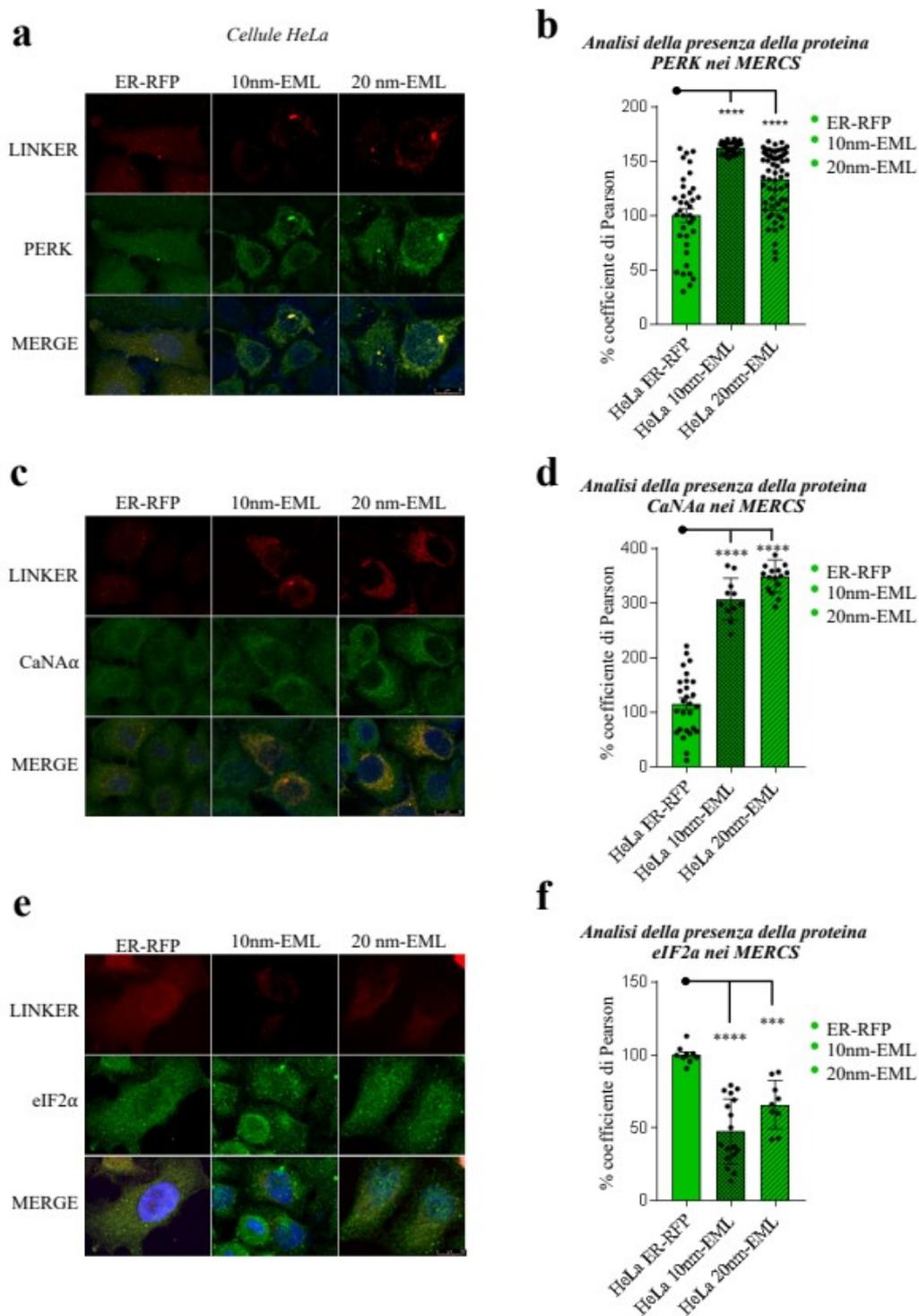


Figura 3.1 Analisi di immunofluorescenza condotta su cellule HeLa Ctr ER-RFP e cellule HeLa esprimenti stabilmente i linker 10nm-EML e 20nm-EML per PERK, CaNA α e eIF2 α .

a, c, e La presenza di PERK, CaNA α e eIF2 α è stata evidenziata utilizzando gli anticorpi anti-PERK (rabbit), anti CaNA α (rabbit) e anti-eIF2 α (rabbit), anticorpi secondari biotinilati e streptavidina 633 (in verde). I linker, grazie alla proteina monomerica fluorescente rossa (mRFP), sono mostrati in rosso. Il DAPI è stato utilizzato per colorare i nuclei (in blu). Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale con ingrandimento 63X. Scale bar 10 μ M.

b, d, f Analisi della co-localizzazione dei due fluorofori (verde e rosso), mediante valutazione del coefficiente di Pearson (n=15-20 cellule per gruppo sperimentale da 3 vetrini indipendenti). I dati sono rappresentati come percentuale del valore medio del coefficiente di Pearson \pm SEM rispetto alla condizione ER-RFP. La significatività è stata ottenuta mediante one way ANOVA (**p \leq 0,001, ***p \leq 0,0001).

Tali risultati suggeriscono che, non solo PERK ma tutte le proteine sono localizzate in prossimità del RE, come evidenziato dal Ctr ER-RFP. Inoltre, con queste analisi è emerso che PERK e CaNA α sono localizzati nei MERCS alle distanze di 10 e 20 nm imposte dai linker, mentre la presenza di eIF2 α nei MERCS alla distanza di 10 nm e 20nm sembra sfavorita.

3.2 Nei MERCS i linker modulano la localizzazione di CaNA α e di eIF2 α ma non di PERK in astrociti ippocampali ACN-KO

Una volta verificata la possibilità di valutare la presenza del complesso nei MERCS con lo studio di co-localizzazione nel modello preliminare di HeLa, abbiamo deciso di procedere utilizzando le nostre cellule di interesse, ossia astrociti ippocampali ACN-Ctr e ACN-KO.

Per verificare se in presenza (ACN-Ctr) o assenza di CaNB1(ACN-KO) vi sia un'alterazione della localizzazione delle proteine coinvolte nel complesso, PERK, CaNA α e eIF2 α , nei MERCS, sono state preparate delle colture di astrociti ippocampali primari da topi ACN-Ctr (esprimenti sia la subunità CaNA α che CaNB1) e ACN-KO (esprimenti CaNA α , ma non CaNB1). Gli astrociti sono stati trasfettati con i plasmidi esprimenti ER-RFP, il linker da 10 nm (10nm-EML) e il linker da 20 nm (20nm-EML) per 48 ore. In seguito, gli astrociti sono stati fissati e sottoposti ad un'analisi di immunofluorescenza con anticorpi primari anti-PERK, anti-CaNA α e anti-eIF2 α , anticorpi secondari biotinilati e streptavidina-633. I linker e i controlli sono mostrati in rosso. Le proteine sono rappresentate dal colore bianco, invece i nuclei evidenziati con il DAPI, in blu.

Al fine di ottenere i dati circa la co-localizzazione di queste proteine nei MERCS è stata effettuata l'analisi del coefficiente di Pearson come descritto nel paragrafo 3.1.

Per quanto concerne PERK, essa si trova sul RE, come atteso. Mediante l'analisi del coefficiente di Pearson non sono state evidenziate differenze significative di co-localizzazione del segnale bianco che rappresenta le proteine e il segnale rosso della RFP (Figura 3.2 d). I dati sono rappresentati come valore medio del coefficiente di Pearson \pm SEM rispetto alla condizione ACN-Ctr ER-RFP. Questo significa che i linker e le distanze da essi fissate non modulano la localizzazione della

proteina PERK in corrispondenza dei siti di contatto RE-mitocondrio negli astrociti ippocampali primari dei modelli murini ACN-Ctr e ACN-KO rispetto alla condizione di controllo ACN-Ctr ER-RFP.

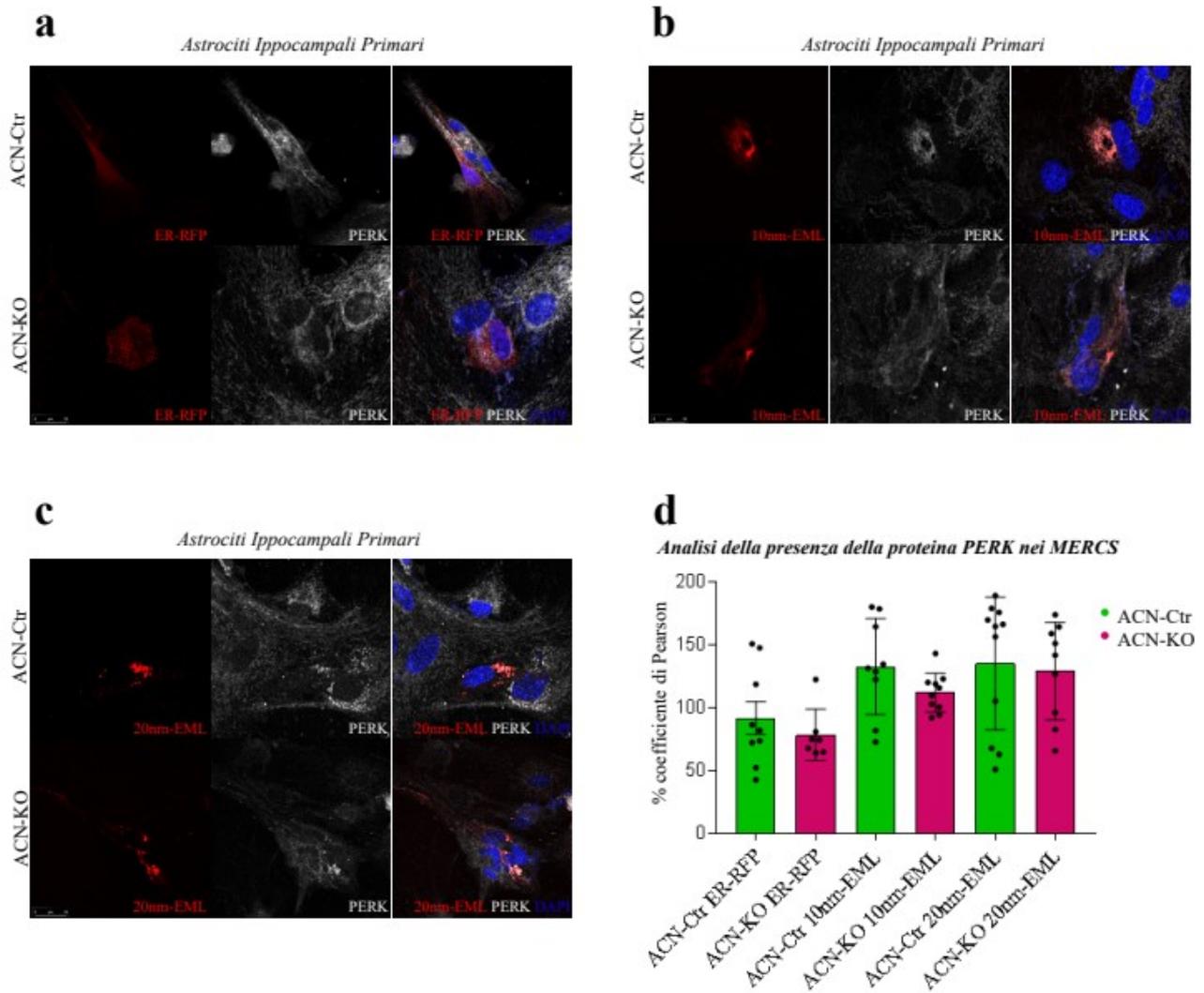


Figura 3.2 Analisi di immunofluorescenza condotta su astrociti primari ippocampali da topi ACN-Ctr e ACN-KO per PERK.

a, b, c Immagini rappresentative dell'analisi in immunofluorescenza per la valutazione dell'espressione e localizzazione di PERK in astrociti ippocampali primari esprimenti: ER-RFP, 10nm-EML e 20nm-EML. La presenza di PERK è stata evidenziata utilizzando l'anticorpo anti-PERK (rabbit), rilevato con anticorpo secondario anti-rabbit biotilato e streptavidina-633 (in bianco) per amplificare il segnale. I linker possiedono una sequenza che codifica per la proteina monomerica fluorescente rossa (mRFP) (in rosso). Il colorante fluorescente DAPI è stato utilizzato per la colorazione dei nuclei (in blu). Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale con ingrandimento 63X. Scale bar 25 μ M.

- d** Analisi della co-localizzazione, mediante valutazione del coefficiente di Pearson (n=15-20 cellule per gruppo sperimentale acquisite da 3 vetrini indipendenti). I dati sono rappresentati come percentuale del valore medio del coefficiente di Pearson \pm SEM rispetto alla condizione ACN-Ctr ER-RFP.

Per quanto riguarda la proteina CaNA α , non sono emerse differenze di co-localizzazione fra gli astrociti ippocampali di topi ACN-Ctr ER-RFP e ACN-KO ER-RFP. Invece, è stata osservata una riduzione significativa della co-localizzazione negli astrociti ACN-KO (esprimenti solo CaNA α ma non CaNB) trasfettati con il linker da 10 nm (10nm-EML). Dalle immagini acquisite al microscopio confocale (Figura 3.3 a, b, c) emerge una diminuzione della sovrapposizione dei colori rosso (che indica il linker) e bianco (che indica la proteina) (Figura 3.3 a, b, c), diminuzione che è risultata essere significativa con l'analisi del coefficiente di Pearson come descritto sopra (Figura 3.3 d). Negli astrociti esprimenti i linker da 20 nm (20nm-EML) non si osservano differenze significative di localizzazione della proteina.

Questi dati sottolineano che, in assenza di CaNB1 (ACN-KO), la localizzazione di CaNA α sia sfavorita nei contatti da 10nm, ma non in quelli da 20nm, in cui la localizzazione della proteina è paragonabile alla condizione di controllo ER-RFP.

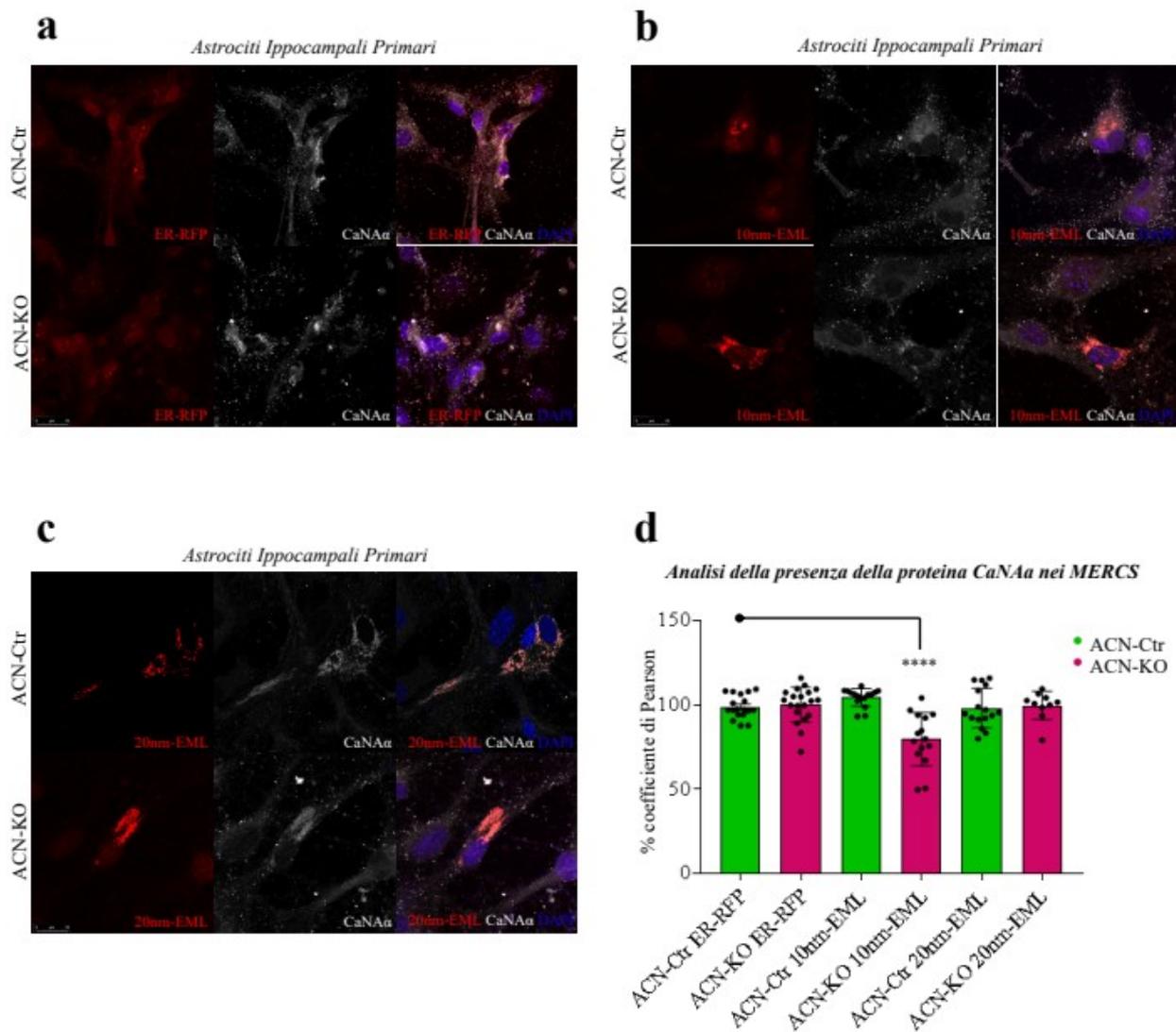


Figura 3.3 Analisi di immunofluorescenza condotta su astroцитi primari ippocampali da topi ACN-Ctr e ACN-KO per CaNA α .

a, b, c Immagini rappresentative dell'analisi in immunofluorescenza per la valutazione dell'espressione e localizzazione di CaNA α in astroцитi ippocampali primari esprimenti: ER-RFP, 10nm-EML e 20nm-EML. La presenza di CaNA α è stata evidenziata utilizzando l'anticorpo anti-panCaNA α (rabbit), rilevato con anticorpo secondario anti-rabbit biotilato e streptaavidina-633 (in bianco). La colorazione rossa è esplicitiva del fatto che le cellule siano trasfettate con i LINKER. Il colorante fluorescente DAPI è stato utilizzato per i nuclei (in blu). Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale con ingrandimento 63X. Scale bar 25 μ M.

d Analisi della co-localizzazione dei due fluorofori (bianco e rosso), mediante valutazione del coefficiente di Pearson (n=15-20 cellule per gruppo sperimentale acquisite da 3 vetrini indipendenti). I dati sono rappresentati come percentuale del valore medio del coefficiente di Pearson \pm SEM rispetto alla condizione ACN-Ctr ER-RFP. La significatività è stata ottenuta mediante one way ANOVA (****p \leq 0,0001).

Negli astrociti ippocampali primari, il fattore di inizio della traduzione eucariotica 2 (eIF2 α) nei modelli ACN-KO ER-RFP localizza meno in prossimità del RE (Figura 3.4 a, b, c). L'analisi è stata condotta utilizzando il coefficiente di Pearson come descritto precedentemente. Questa ridotta co-localizzazione di eIF2 α non corrisponde a una riduzione dei livelli di espressione della proteina o del suo trascritto (vedi dati preliminari). Gli astrociti ACN-Ctr esprimono stabilmente i linker da 10 nm (10nm-EML) presentano una leggera diminuzione della co-localizzazione che però non è significativa. Invece, gli astrociti ACN-KO trasfettati con i linker da 10 nm (10nm-EML) e da 20 nm (20nm-EML) mostrano la medesima co-localizzazione della condizione di controllo ACN-Ctr ER-RFP (Figura 3.4 d), a sottolineare che l'espressione dei due linker riporta la localizzazione della proteina ai livelli del controllo ER-RFP.

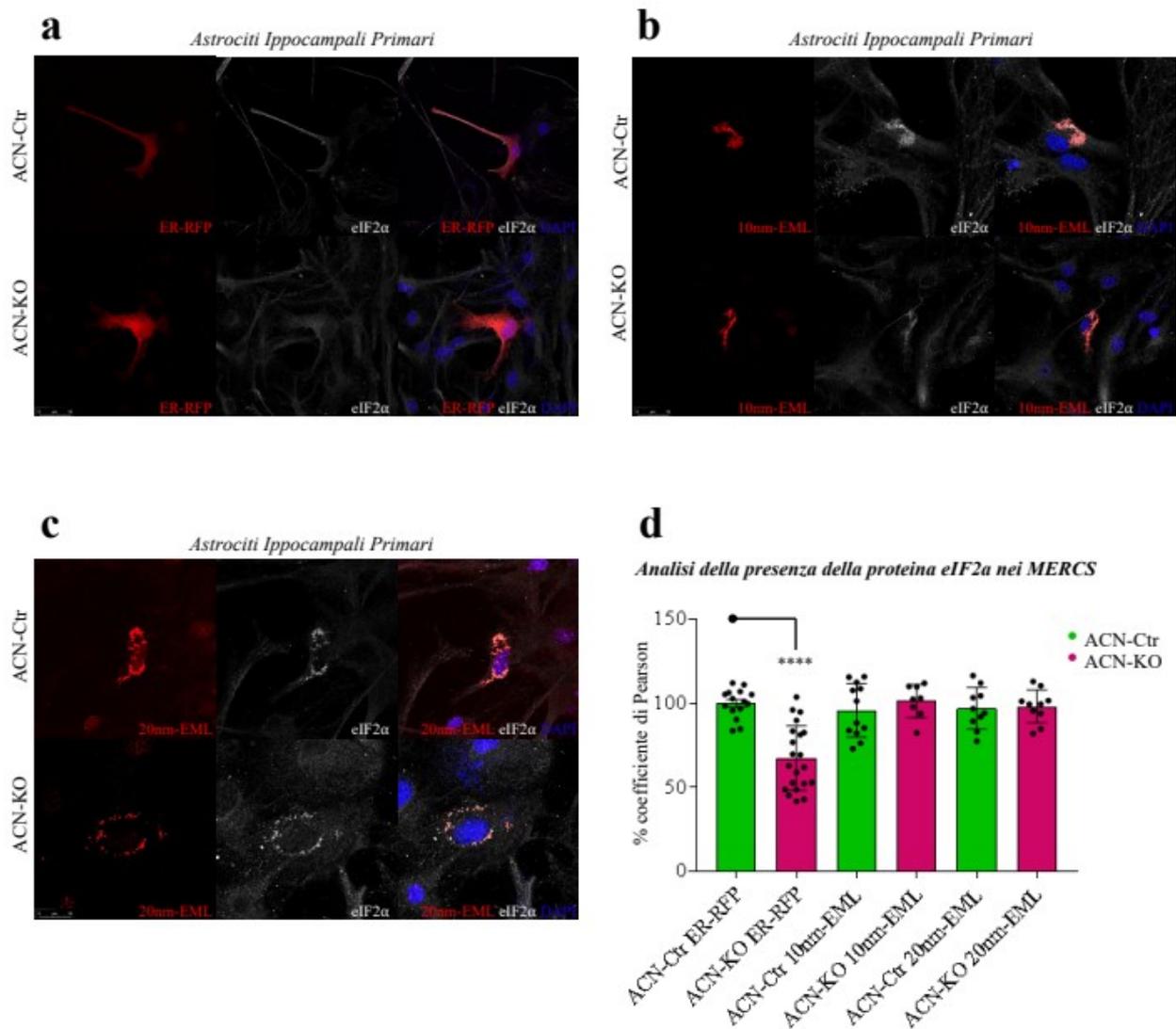


Figura 3.4 Analisi di immunofluorescenza condotta su astrociti primari ippocampali da topi ACN-Ctr e ACN-KO per eIF2 α .

- A. Immagini rappresentative dell'analisi in immunofluorescenza per la valutazione dell'espressione e localizzazione di eIF2 α in astrociti ippocampali primari esprimenti: ER-RFP, 10nm-EML e 20nm-EML. La presenza di eIF2 α è stata evidenziata utilizzando l'anticorpo anti-eIF2 α (rabbit), rilevato con anticorpo secondario anti-rabbit biotilato e streptavidina-633 (in bianco). La colorazione rossa è esplicitiva del fatto che le cellule siano trasfettate con i LINKER. Il colorante fluorescente DAPI è stato utilizzato per i nuclei (in blu). Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale con ingrandimento 63X. Scale bar 25 μ M.
- B. Analisi della co-localizzazione dei due fluorofori (bianco e rosso), mediante valutazione del coefficiente di Pearson (n=15-20 cellule per gruppo sperimentale acquisite da 3 vetrini indipendenti) I dati sono rappresentati come percentuale del valore medio del coefficiente di Pearson \pm SEM rispetto alla condizione ACN-Ctr ER-RFP. La significatività è stata ottenuta mediante one way ANOVA (****p \leq 0,0001).

I risultati ottenuti da queste analisi, ossia che CaNA α è meno presente nei contatti a 10nm mentre eIF2 α è meno presente in prossimità del RE, evidenziano la relazione di dipendenza fra l'assenza di CaNB1 e la localizzazione di CaNA α e eIF2 α nei MERCS. Questo suggerisce che ci possano essere differenze nei contatti fra astrociti ippocampali ACN-KO (esprimenti solo CaNA α) rispetto ai ACN-Ctr (esprimenti sia CaNA α che CaNB).

3.3 I MERCS sono alterati dalla delezione di CaNB1: i contatti da 30 nm risultano diminuiti in astrociti ippocampali ACN-KO

Per approfondire quanto precedentemente osservato, ossia che la localizzazione di PERK non cambia nei MERCS, la localizzazione di CaNA α è ridotta nei contatti da 10nm solo nei ACN-KO e eIF2 α è meno localizzata a livello del RE nei ACN-Ctr vs ACN-KO, abbiamo deciso di utilizzare le sonde SPLICS al fine di misurare le distanze ER-MIT tra i due genotipi. Astrociti ippocampali primari di modelli murini ACN-Ctr e ACN-KO sono stati trasfettati con le sonde SPLICS. In particolare, per coprire un maggiore range dinamico di distanze RE-MIT rispetto a quanto fatto nei precedenti esperimenti, sono stati sfruttati SPLICS che rilevano distanze di 10nm (definiti SPLICS-short), SPLICS in grado di rilevare distanze di 20nm (SPLICS-20) (Dematteis *et al*, 2024)⁵⁸ e SPLICS che rilevano una distanza di 30-40nm (SPLICS-long) (Cieri *et al*, 2018)⁵¹. A 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state fissate ed è stata condotta un'analisi di immunofluorescenza. Sono state poi acquisite immagini al microscopio confocale (Figura 3.5 a) nelle quali è stata analizzata l'intensità di fluorescenza per cellula come CFTF (Corrected Total Cell Fluorescence) (Gavet *et Pines*, 2010)⁵⁹.

Da queste analisi è stato osservato che in tutti gli astrociti di modelli ACN-KO trasfettati con SPLICS vi è una tendenza alla riduzione dell'intensità di fluorescenza (Figura 3.5 a) che risulta significativa solo nei contatti più lunghi, a 30-40 nm (Figura 3.5 b). I dati sono rappresentati come percentuale della media del valore di CTCF (intensità di fluorescenza per cellula) (Figura 3.5 b). Il risultato ottenuto dall'analisi di immunofluorescenza è alquanto sorprendente poiché la tendenza alla riduzione per tutti i tipi di contatti (10 nm, 20 nm e 30-40 nm) denota una ridotta relazione tra i due organelli e di conseguenza una possibile alterazione dei processi ad essi correlati. In particolare, i processi a 10 nm possono influenzare la sintesi lipidica, i processi a 20 nm possono modificare i segnali di Ca^{2+} tra RE e mitocondrio; invece, i processi a 30 nm possono alterare la sintesi proteica. Coerentemente con quanto precedentemente dimostrato e riportato nei dati preliminari, ossia una riduzione della sintesi proteica nei modelli ACN-KO, vi è una riduzione dei contatti in corrispondenza dei quali questa avviene.

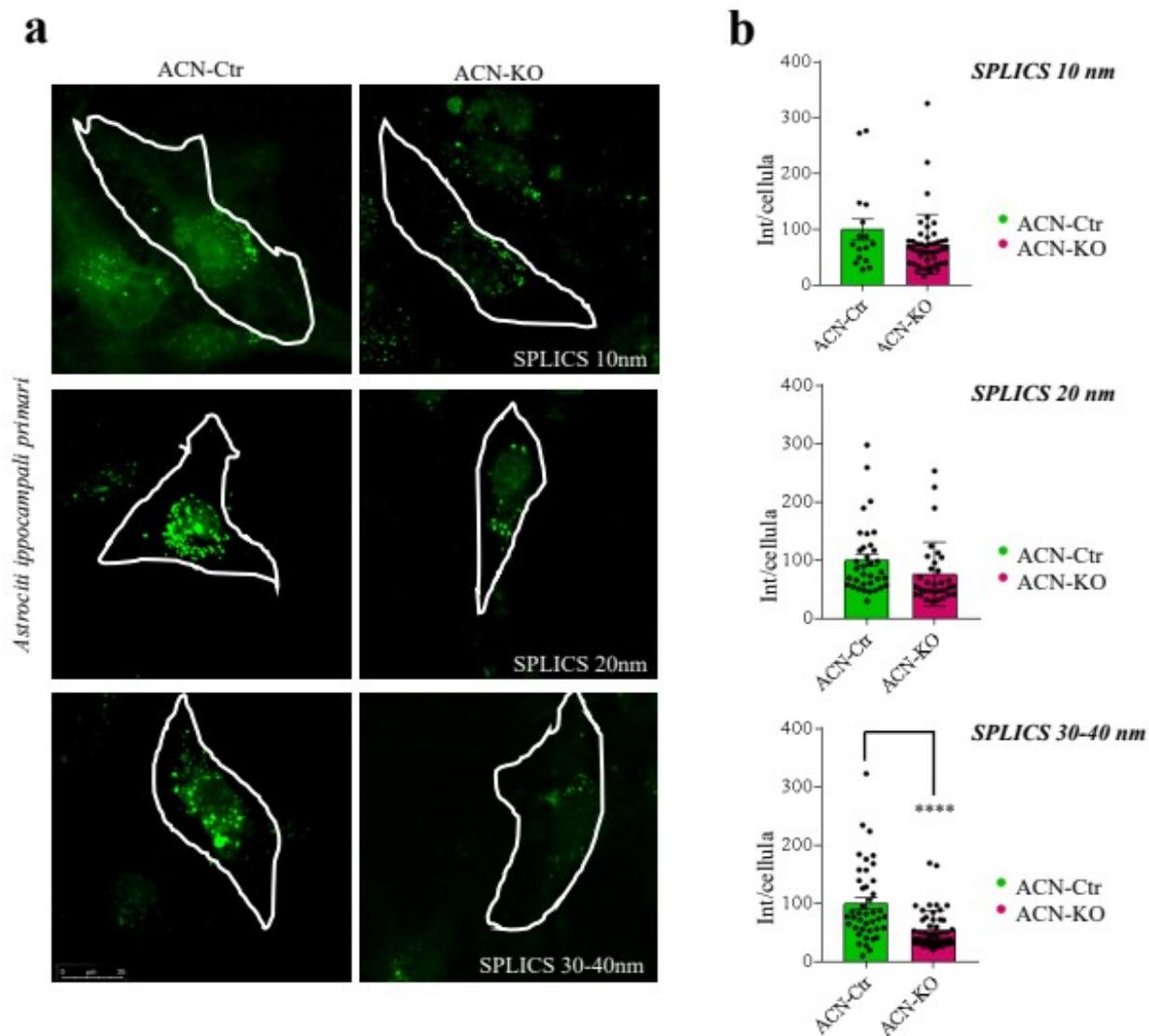


Figura 3.5 Analisi di immunofluorescenza di astrociti primari ippocampali trasfettati con SPLICS-short (10nm), SPLICS-20 (20nm) e SPLICS-long (30-40nm)

- a.** Immagini rappresentative della distanza RE-MIT in astrociti primari ippocampali ACN-Ctr e ACN-KO esprimenti SPLICS 10nm, SPLICS 20nm, SPLICS 30-40nm. Il segnale degli SPLICS è mostrato in verde. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale con ingrandimento 63X. Scale bar 25 μ M.
- b.** Analisi dell'intensità di fluorescenza per cellula nelle tre condizioni sperimentali (SPLICS-short, SPLICS-20, SPLICS-long). I dati sono stati ottenuti utilizzando tre esperimenti indipendenti ($n= 15-20$ cellule) ed espressi come percentuale della media del valore di CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence) rispetto al controllo ACN-Ctr. La significatività è stata valutata mediante T-Test (**** $p \leq 0,0001$).

3.4 Le dinamiche di Ca^{2+} mitocondriale sono alterate in astrociti ippocampali ACN-KO

Dai dati ottenuti dalle precedenti analisi è risultato chiaro che la delezione di CaNB1 influenzi la localizzazione delle proteine del complesso nei MERCs, a specifiche distanze per CaN e su RE per eIF2 α , e che di per sé stessi i MERCs siano alterati nei modelli ACN-KO. Questi dati ci hanno spinto a valutare l'efficienza del trasferimento di Ca^{2+} tra RE e MIT, in quanto l'integrità di questi contatti e dei complessi proteici in essi espressi, quali IP₃R-VDAC, è fondamentale per il signalling del Ca^{2+} tra questi organelli.

Con questo obiettivo, le dinamiche mitocondriali di Ca^{2+} in astrociti ippocampali primari ACN-Ctr e ACN-KO sono state misurate con la sonda Mt-fura-2, a seguito di stimolazione con ATP 100 μM . Da queste analisi emerge che le cellule ACN-KO (esprimenti solo CaNA α) mostrano una risposta significativamente ridotta allo stimolo quando confrontate con i rispettivi controlli (ACN-Ctr) (Figura 3.6 a, b). Questa alterazione delle dinamiche di Ca^{2+} mitocondriale potrebbe essere imputata a un inefficiente trasferimento di Ca^{2+} fra RE e mitocondrio in corrispondenza dei MERCs suggerendo che la delezione di CaNB1 e l'alterazione dei contatti possa avere un ruolo chiave nell'omeostasi di Ca^{2+} negli organelli.

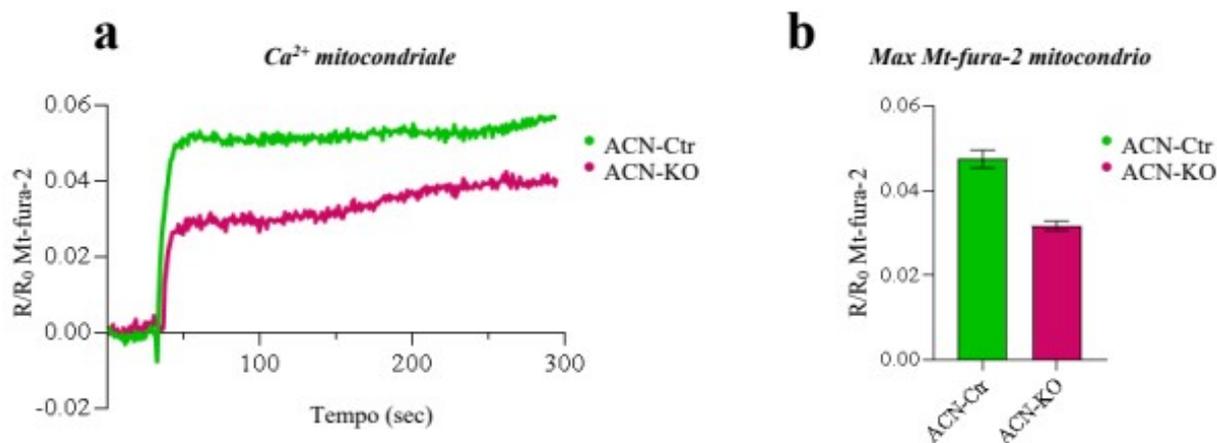


Figura 3.6 Analisi delle dinamiche di Ca^{2+} mitocondriale in astrociti ippocampali primari ACN-Ctr e ACN-KO

a Traccia della $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ in funzione del tempo in astrociti ippocampali primari ACN-Ctr e ACN-KO. Come sonda è stata utilizzata Mt-fura-2 (Pendin et al, 2019)⁶⁰. Le cellule sono state stimolate con ATP 100 μM . Lo stimolo è stato fornito dopo 30s di registrazione del segnale basale, il quale è stato poi seguito per i successivi 300s dallo stimolo. I valori sono espressi come rapporto R/R₀ (340nm/380nm) in funzione del tempo.

- b** Boxplot rappresentante il picco massimo della risposta evocata dallo stimolo (ATP 100 μ M) in astrociti ippocampali primari ACN-Ctr e ACN-KO. I valori sono espressi come rapporto $R/R_0 \pm$ SEM in funzione del tempo.

3.5 Dalle proteine coinvolte nel pathway dell'UPR solo i livelli di ATF4 sono ridotti in astrociti ippocampali ACN-KO

Vista la riduzione della fosforilazione del fattore di iniziazione della traduzione eucariotica eIF2 α , la diminuzione della sintesi proteica (come riportato nei dati preliminari), vista l'alterazione dei siti di contatto RE-mitocondrio (MERCs) e delle proteine coinvolte nel complesso CaNA α -PERK-eIF2 α e vista l'alterazione delle dinamiche di Ca²⁺ mitocodriale, è stato ipotizzato che tali eventi potessero dipendere da una attivazione del pathway dell'UPR o da una alterazione delle proteine del signalling del Ca²⁺.

L'UPR è una risposta che la cellula mette in atto in seguito all'accumulo di proteine unfoldate nel RE oppure in seguito a un eccessivo rilascio o aumento di Ca²⁺. Svolgono un ruolo importante tre trasduttori di segnale situati nel RE: PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1 α (Inositol-Requiring Enzyme 1 α) e ATF6 (Activating Transcription Factor 6). CaNA promuove l'auto-fosforilazione di PERK che in condizioni di stress inibisce la traduzione proteica generale (Walter and Ron, 2011)³⁹. Questo evento riduce il carico di proteine che entrano nel reticolo endoplasmatico di una cellula stressata ma consente anche la traduzione selettiva dell'mRNA che codifica il fattore di trascrizione ATF4, contribuendo così al rafforzamento di una risposta antiossidante, al potenziamento della capacità di ripiegamento del RE e all'induzione dell'apoptosi, in caso di stress cronico.

Per verificare se ci fosse una variazione dell'espressione delle proteine dell'UPR (PERK, ATF6 e ATF4) sono stati condotti esperimenti di SDS-PAGE, WB su lisati totali di astrociti ippocampali primari ACN-Ctr e ACN-KO (Figura 3.7 a). Le membrane sono state incubate con anticorpi primari anti-PERK, anti-ATF6 e anti-ATF4 e anticorpi secondari adeguati. Le immagini che riportano le bande rappresentative sono state acquisite con lo strumento ChemiDocTM Imaging System (Bio-Rad). Per la normalizzazione del risultato le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario anti- β -actina. Tutte le immagini sono state analizzate e quantificate utilizzando Image Lab 6.1 (Bio-Rad), software che fornisce i valori di intensità delle bande ottenute al ChemiDocTM. Come si può osservare nell'immagine seguente (Figura 3.7 a) e dall'analisi densitometrica delle bande (Figura 3.7 b, c, d), è emerso che i livelli di PERK e ATF6 non cambiano in modo statisticamente

significativo (Figura 3.7 b, c) nei ACN-KO vs ACN-Ctr. Si può osservare, invece, una lampante riduzione del segnale nelle bande rappresentative per ATF4 in astrociti ACN-KO, riduzione che risulta essere significativa (Figura 3.7 d). La significatività è stata valutata mediante T-Test (* = $p \leq 0.05$).

Questi risultati sembrano confermare che probabilmente non vi sia una attivazione dell'UPR nei ACN-KO o meglio una attivazione eIF2 α -PERK dipendente, come già osservato nei dati preliminari su ippocampi da topi ACN-KO. Ancora controversa è, invece, l'interpretazione della riduzione dell'espressione del fattore ATF4, lasciando spazio ad una ulteriore futura analisi sulla eventuale localizzazione nucleare della proteina, che ne motiverebbe la riduzione. Un'altra possibilità è che essa abbia un ruolo nella modulazione della risposta allo stress mitocondriale i cui meccanismi sono più comunemente associati alla proteina ATF5 ma che recentemente hanno coinvolto anche ATF4 (Quiròs *et al*, 2017)⁶¹ (Wu *et al*, 2024)⁶².

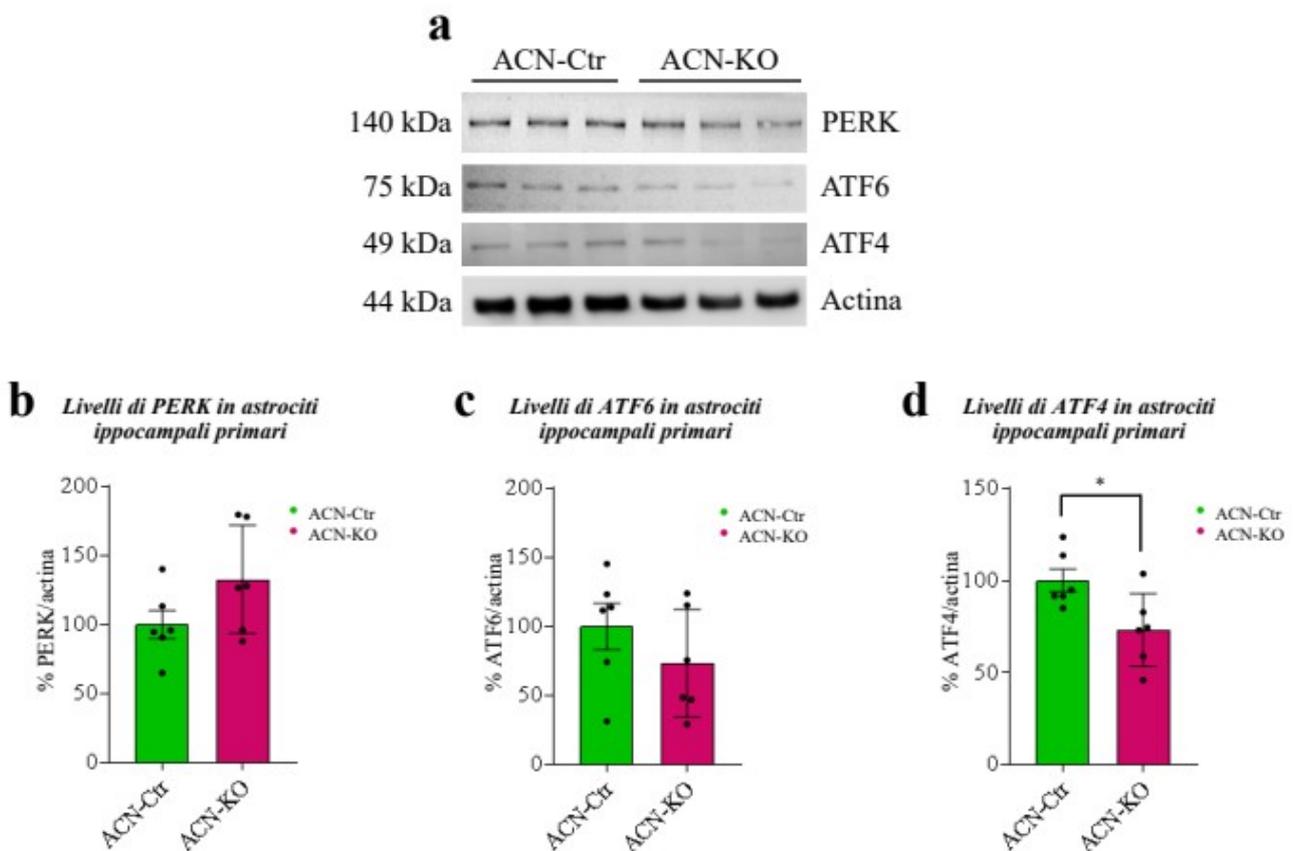


Figura 3.7 Analisi di espressione del pathway dell'UPR su lisato totale ippocampale di astrociti da topi ACN-Ctr e ACN-KO

- a** Analisi dei livelli di espressione totale delle proteine dell'UPR PERK, ATF6 e ATF4 con WB su lisato totale da coltura primaria ippocampale di astrociti da topi ACN-Ctr e ACN-KO (n=3 ACN-Ctr, n=3 ACN-KO per due replicati).
- b, c, d** Analisi densitometrica delle bande di PERK, ATF6, e ATF4. Il segnale è stato normalizzato sul segnale dell'actina. I dati sono espressi come percentuale del valore medio \pm SEM rispetto a ACN-Ctr. La significatività è stata valutata mediante T-Test (* = $p \leq 0.05$).

3.6 I livelli di proteina IP₃R sono ridotti in astrociti ippocampali ACN-KO

Sugli stessi campioni è stata valutata l'espressione delle proteine del toolkit del Ca²⁺ al fine di verificare se le differenze di trasferimento di Ca²⁺ da RE a MIT fossero dovute ad una alterazione delle proteine che formano il complesso di trasferimento di Ca²⁺ fra i due organelli, ossia il recettore dell'inositolo-1,4,5-trifosfato (IP₃R), un canale anionico voltaggio dipendente (VDAC), l'unipoter del Ca²⁺ mitocondriale (MCU) e la proteina regolata dal glucosio 75 (Grp75).

È stata inizialmente condotta un'analisi di SDS-PAGE, WB su lisati totali ippocampali di astrociti da topi ACN-Ctr e ACN-KO per valutare l'espressione di MCU, VDAC e Grp75 ed IP₃R nei MERCS. Le membrane sono state incubate con anticorpi primari anti-MCU, anti-VDAC e anti-Grp75 e anticorpi secondari adeguati al fine di rivelarne il segnale. Le immagini sono state acquisite e analizzate come precedentemente descritto (paragrafo 3.4). Dall'immagine seguente (Figura 3.8 a) e dall'analisi densitometrica delle bande (Figura 3.8 b, c, d), è possibile notare una tendenza alla riduzione dei livelli di MCU, VDAC e Grp75 che però non è statisticamente significativa.

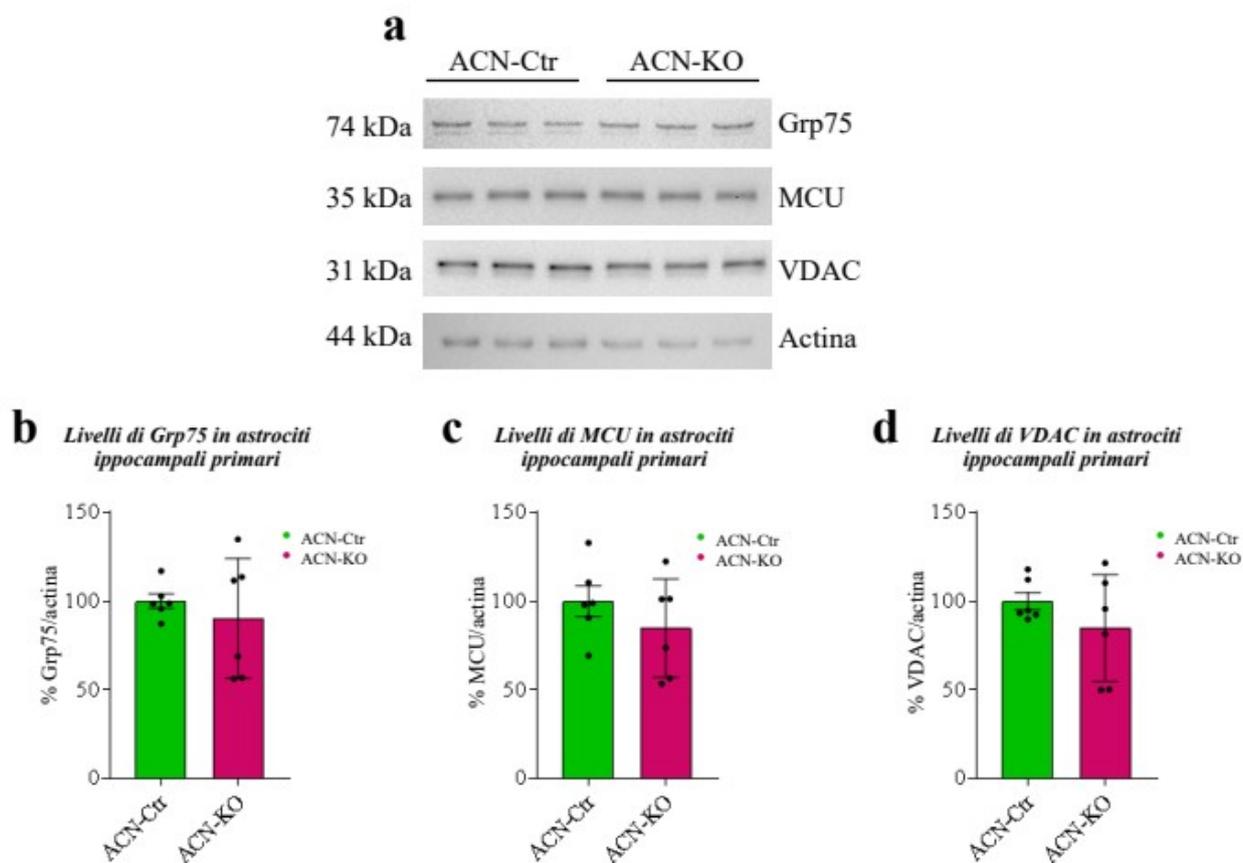


Figura 3.8 Analisi dell'espressione delle proteine coinvolte nel signalling del Ca^{2+} su lisato totale ippocampale di astrociti da topi ACN-Ctr e ACN-KO

- a** Analisi dei livelli di espressione totale delle proteine Grp75, MCU e VDAC con WB su lisato totale da coltura primaria ippocampale di astrociti da topi ACN-Ctr e ACN-KO (n=3 ACN-Ctr, n=3 ACN-KO per due replicati).
- b, c, d** Analisi densitometrica delle bande di GRP75, MCU e VDAC. Il segnale è stato normalizzato sul segnale dell'actina. I dati sono espressi come percentuale del valore medio \pm SEM rispetto a ACN-Ctr. La significatività è stata valutata mediante T-Test (* = $p < 0.05$).

Un'analisi separata è stata eseguita per valutare i livelli dei recettori dell'inositolo trifosfato (IP_3R), famiglia di canali di rilascio IP_3 -dipendenti situati sulla membrana del RE che mediano il rilascio di Ca^{2+} dal RE. Esistono tre isoforme del recettore IP_3R , $\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ e $\text{IP}_3\text{R3}$. Lisati totali ippocampali di astrociti ACN-Ctr e ACN-KO sono stati sottoposti a SDS-PAGE, WB: le membrane sono state incubate con anticorpo primario anti- IP_3R e anticorpo secondario adeguato. L'acquisizione e l'analisi delle immagini è stata effettuata nelle stesse modalità descritte precedentemente. Dall'immagine seguente (Figura 3.9 a) e dall'analisi densitometrica delle bande (Figura 3.9 b) si osserva una riduzione significativa dell'espressione di IP_3R negli astrociti ACN-KO. La

significatività è stata valutata mediante T-Test (* = $p < 0.05$). L'anticorpo utilizzato in queste analisi, però, riconosce tutte le isoforme del recettore per cui non è stato possibile definire in maniera specifica quale delle tre isoforme risulta essere ridotta nelle cellule ACN-KO. Questi dati ci suggeriscono una generale riduzione dei livelli di espressione di IP₃R negli astrociti, non solo a livello dei MERCs, in accordo con dati presenti in letteratura circa la modulazione trascrizionale CaN-dipendente del recettore nei neuroni (Genazzani *et al*, 1999)⁶³.

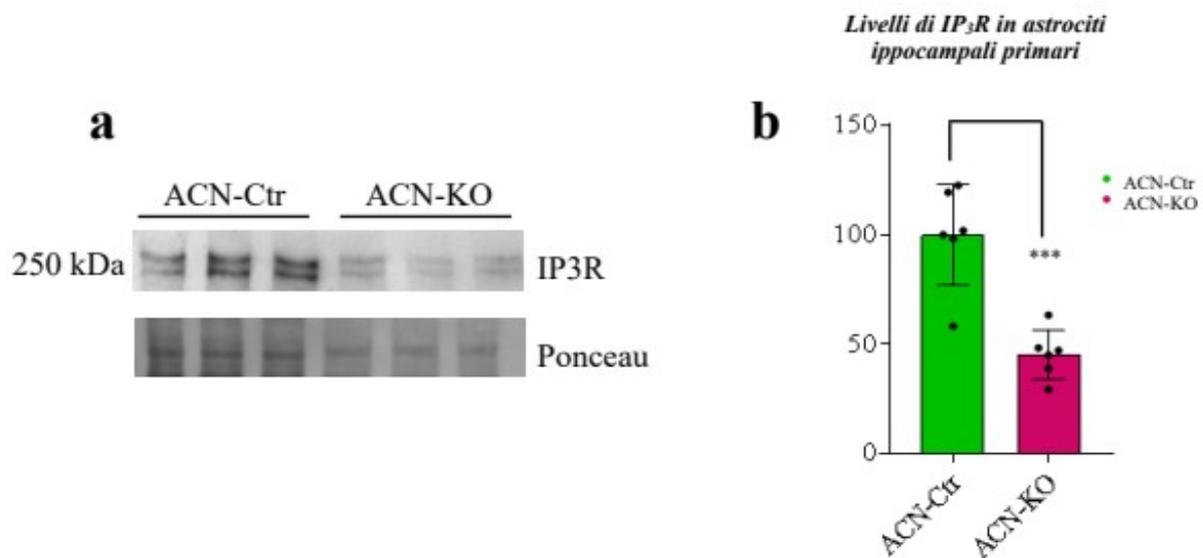


Figura 3.9 Analisi dell'espressione proteica del recettore IP₃ su lisato totale ippocampale di astrociti da topi ACN-Ctr e ACN-KO

- a** Analisi dei livelli di espressione totale di IP₃R con WB su lisato totale da coltura primaria ippocampale di astrociti da topi ACN-Ctr e ACN-KO (n=3 ACN-Ctr, n=3 ACN-KO per due replicati).
- b** Analisi densitometrica delle bande di IP₃R. Il segnale è stato normalizzato su Ponceau S 0.1% (Ponceau Staining), colorazione utilizzata per la normalizzazione delle proteine. I dati sono espressi come valore medio ±SEM rispetto al Ctr. La significatività è stata valutata mediante T-Test (**p ≤ 0,001).

Conclusioni e sviluppi futuri

Mediante lo studio del modello ACN-KO è emerso che la delezione di CaNB1 impatti massivamente sulla fisiologia astrocitaria, che abbia un effetto sulla regolazione della sintesi proteica e dei pathway dipendenti dal RE (Dematteis et al, 2020)⁵⁷. Inoltre, CaN può formare un complesso con due proteine chiave dell'UPR (PERK e eIF2 α) per regolare i livelli basali di traduzione negli astrociti (Bollo et al, 2010)³⁸ (Tosello et al, 2016)³⁴ (Tapella, Soda et al, 2020)²⁵.

Gli esperimenti condotti in laboratorio si sono focalizzati sulla relazione di dipendenza tra le proteine formanti il complesso CaNA α -PERK-eIF2 α e i MERCS, siti di contatto fra reticolo endoplasmatico e mitocondrio.

I dati ottenuti hanno permesso di dimostrare che negli astrociti ACN-KO le proteine formanti il complesso sono osservabili nei MERCS (presi in esame con i linker 10nm-EML e 20nm-EML), ma con delle sostanziali differenze: CaNA α è meno presente nei contatti da 10 nm mentre eIF2 α è meno presente in prossimità del RE. Nonostante queste significative differenze, negli astrociti ippocampali ACN-KO e negli astrociti umani trattati con FK506 (vedi dati preliminari) il complesso CaNA α -PERK-eIF2 α si forma ugualmente. Quello che emerge è quindi che le proteine possano interagire a livello dei MERCS, ma probabilmente il complesso risente della distanza tra ER-MIT suggerendo che la rilevanza fisiologica di tale interazione sia correlata a specifiche distanze. Attraverso l'utilizzo delle sonde SPLICS-long (30-40 nm) abbiamo osservato una significativa riduzione dei contatti, coerentemente con la riduzione della sintesi proteica, processo che presumibilmente richiede distanze adeguate all'alloggiamento dei ribosomi e al complesso di iniziazione di cui eIF2 α fa parte e ne regola primariamente il funzionamento. Nonostante ciò, sembra che l'assenza di CaNB1 non influenzi l'attivazione del ramo PERK-dipendente dell'UPR, pare invece essere responsabile della riduzione dell'espressione del recettore dell'IP₃ e dell'alterazione delle dinamiche di Ca²⁺ mitocondriali. Questi ultimi dati suggeriscono una possibile disfunzione mitocondriale, nota come mitochondrial stress response in cui ATF4, che noi abbiamo visto essere fortemente ridotto nei ACN-KO, è stato recentemente riconosciuto come possibile mediatore (Wu et al, 2024)⁶². Lo studio di questo complesso nei MERCS degli astrociti è rilevante per la comprensione di processi patologici associati a diverse malattie neurodegenerative, in cui si osserva alterazione dell'espressione di CaN, attivazione dell'UPR e disfunzioni mitocondriali.

Con queste conoscenze, gli obiettivi futuri si muovono in due direzioni: da un lato ulteriori studi saranno condotti su modelli umani di iPSCs (induced Pluripotent Stem Cells) al fine di valutare la relazione fra il complesso e i MERCS nei processi di differenziamento neuronale, dall'altro il modello ACN-KO sarà utilizzato per lo studio sulla ALS (Sclerosi Laterale Amiotrofica) in quanto

nei modelli patologici è stata osservata un'alterazione dei MERCS, della capacità secretoria e del Ca^{2+} signalling.

Materiali e metodi

5.1 Colture cellulari

Le cellule utilizzate per condurre gli esperimenti sono di due tipi: cellule HeLa e astrociti primari ippocampali.

Le cellule HeLa sono cellule immortalizzate derivanti da un carcinoma della cervice uterina, in grado di dividersi un numero infinito di volte avendo esse un enzima telomerasi particolarmente attivo che impedisce ai telomeri di accorciarsi. Le linee cellulari utilizzate sono cellule HeLa stabilmente trasfettate con 10nm-EML, 20nm-EML e ER-RFP precedentemente generate nel laboratorio in cui ho svolto la tesi. Al fine di generare linee cellulari stabilmente esprimenti i linker, 24 ore dopo la piastratura (10^4 cellule/pozzetto in piastra da 24 pozzetti) le cellule sono state infettate con particelle lentivirali che esprimono ER-RFP, 10nm-EML, 20nm-EML (*Lim et al, 2016*)⁶⁴. Dopo aver raggiunto la confluenza, le cellule sono state espanse e arricchite utilizzando la tecnica fluorescence-activated cell sorting (S3e Cell Sorter, Bio-Rad, Segrate, Milan, Italy). In questo modo le cellule selezionate sono state espanse e congelate fino all'utilizzo. Queste cellule sono state mantenute in coltura in piastre utilizzando il terreno di coltura DMEM completo (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) arricchito con 10% di siero bovino (FBS, cat. 10270-106, Gibco), 2 mg/ml di glutammina (cat. G7513, Sigma-Aldrich), 10 U/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomicina (cat. P0781, Sigma-Aldrich). Le cellule sono state passate ogni volta che raggiungevano il 70-80% di confluenza. Una volta staccate, sono state piastrate 20000 cellule in multiwell da 24 pozzetti, su vetrini da 13mm, 24 ore prima delle analisi di immunofluorescenza.

Colture primarie di astrociti ippocampali sono state ottenute estraendo il cervello da topi di 3-5 giorni di vita, sacrificati per decapitazione. Il cervello di ciascun animale è stato dissezionato in HBSS freddo, dissociato con tripsina 0.5 mg/ml (37 °C, 20 minuti) e successivamente sottoposto a centrifugazione (400 rpm, 3 minuti). Il pellet così ottenuto è stato risospeso in un terreno medium completo (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) e ripartito in piastre precedentemente trattate con 0.1 mg/mL di Poly-L-lysine (PLL, Sigma) per 20 minuti e lavate due volte con acqua MilliQ. Raggiunta la confluenza, dopo 5-10 giorni, le cellule sono state staccate e piastrate per gli esperimenti. La porzione terminale della coda di ciascun animale è stata conservata per effettuare il genotyping.

5.2 Trasfezione in transiente con plasmidi per l'espressione di ER-RFP, 10nm-EML, 20nm-EML

La trasfezione è una tecnica utilizzata per far esprimere DNA plasmidico in modo stabile o transiente alle cellule. I plasmidi utilizzati per la trasfezione codificano per linker sintetici (EML) disegnati appositamente per imporre una distanza specifica fra il reticolo endoplasmatico (RE) e il mitocondrio e modulare quindi la distanza fra i due organelli.

Il linker che fissa la distanza a 10nm (10nm-EML) è stato donato da Csordàs e dai suoi collaboratori (*Csordàs et al, 2006*)⁴⁹, (*Csordàs et al, 2010*)⁶⁵. È stato sviluppato a partire dalla sequenza della proteina monomerica fluorescente rossa (mRFP) derivata nel 2002 dalla proteina tetrameric fluorescente rossa del corallo *Discosoma* (DsRed). Questa, se eccitata con luce verde ($\lambda=488\text{nm}$), emette nello spettro del rosso. All'N terminale di mRFP è stata aggiunta la sequenza target della proteina di topo mAKAP la quale riconosce e lega la membrana mitocondriale esterna (OMM). Al C terminale di mRFP invece è stata legata la sequenza target proveniente dalla proteina del lievito gammaUBC6 in modo tale che si possa posizionare sulla membrana esterna del RE. Inoltre, sono stati aggiunti degli spaziatori (Spacer) a monte e a valle della sequenza che codifica per la proteina fluorescente mRFP al fine di raggiungere una distanza totale di 10nm. In questo modo la distanza fra il RE e il mitocondrio è fissata artificialmente a 10nm.

La sequenza amminoacidica del linker da 10nm è riportata in seguito; in blu sono rappresentate le sequenze dei domini transmembrana dei due organelli, in rosso la sequenza della proteina monomerica fluorescente rossa (mRFP) ed in verde gli spaziatori:

MAIQL

RSLFPLALPGLLALLGWWFFSRKKDLELKLRLQSTVPRARDPPVATMASSEDDVIKEFMR
FKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYV
KHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLGRGNFSPDGP
VMQKKTMGWEASTERMYPEDGALKGEIKMRLKLDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPG
AYKTDIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGASGLRSRAQASNSRVMVYIGIAIFLFLVGL
FMK

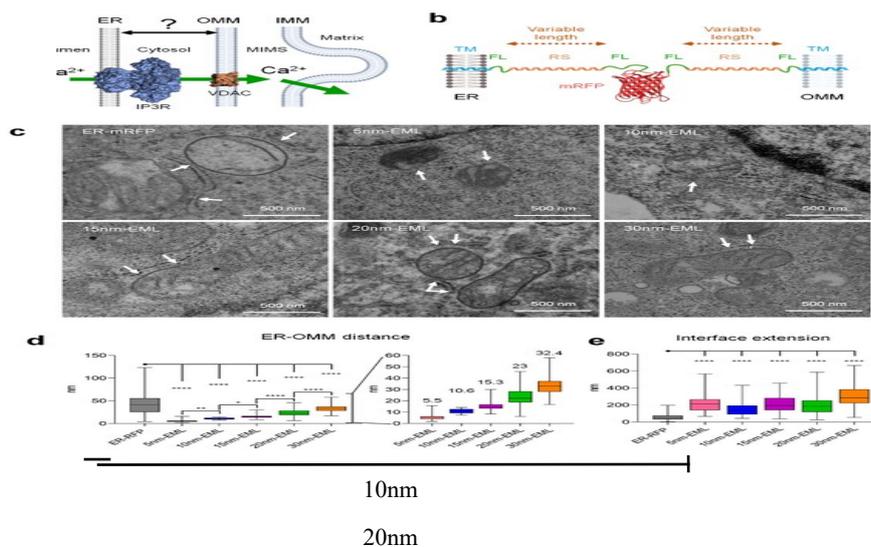
Il linker che fissa la distanza a 20nm (20nm-EML) è stato sintetizzato e caratterizzato dal laboratorio del Prof. D. Lim, in collaborazione con il Prof. R. Miggiano, sfruttando sequenze di localizzazione simili a quelle proposte da Csordàs e collaboratori.

La sequenza amminoacidica del linker da 20nm è riportata in seguito; in blu sono rappresentate le sequenze dei domini transmembrana dei due organelli, in rosso la sequenza della proteina monomerica fluorescente rossa (mRFP) ed in verde gli spaziatori:

MAIQL

RSLFPLALPGLLALLGWWFFSRKKDPTRSANKQQEEEAERLRRIQEEMEKERKRREDE
 QRRRKEEEEERRMKLEMEAKRKQEEERKKREDDEKRIQAERNSDPPVATLASEDVIKEF
 MRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKA
 YVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPS
 DGPVMQKKTMGWEASTERMYPEDGALKGEIKMRLKLDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQ
 LPGAYKTDIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGASGLRSRAQASNSKQEEEAERLRR
 QEEMEKERKRREDEQRRRKEEEEERRMKLEMEAKRKQEEERKKREDDEKRIQAESRAQ
 ASNSRVMVYIGIAIFLVGLFMK

Come controllo (ER-RFP) è stato sfruttato un plasmide in cui solo al C terminale della proteina mRFP è fusa la sequenza target della proteina del lievito gammaUBC6. In questo modo la mRFP è legata solamente al RE e non alla OMM determinando un apporto di proteina rossa comparabile a quello delle cellule esprimenti i linker, senza però funzionare da linker.



Schema 5.1 Schema che illustra il design dei linker RE-mitocondrio. Essi fissano una distanza fra la membrana del reticolo endoplasmatico e la membrana mitocondriale esterna (OMM) pari a 10nm nel caso del linker indicato come 10nm-EML e di 20nm nel caso del linker indicato come 20nm-EML. A monte e a valle della mRFP (monomeric red fluorescent protein) sono presenti gli spaziatori, rappresentati da una colorazione gialla. In blu sono rappresentate le sequenze dei domini transmembrana dei due organelli e in verde i linker flessibili.

Per la trasfezione degli astrociti primari ippocampali è stato utilizzato un mix di trasfezione contenente: OPTIMEM (cat. 11058-021, Invitrogen), lipofectamina 2000 (cat. 11668-019, Invitrogen) e DNA plasmidico necessario per le diversi condizioni sperimentali in rapporto 1:1. Dopo 4 ore, è stato cambiato il terreno e nei giorni successivi (48h) l'efficienza di trasfezione è stata

verificata grazie all'espressione del reporter mRFP da parte dei plasmidi utilizzati (descritti nel paragrafo successivo). Le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti a 48 ore dalla trasfezione.

5.3 Lisi cellulare

Le cellule in coltura sono state sottoposte a lisi per la valutazione dei livelli di proteine presenti. Le cellule sono state contate, in modo da piastrarne 30 000 per pozzetto all'interno di una multiwell da 24 pozzetti. Dopo incubazione di 48 ore che ha permesso il raggiungimento dell'80-100% di confluenza, le cellule sono state lisate.

La lisi delle cellule è stata eseguita utilizzando un tampone di lisi composto da: Tris-HCl 50 mM (pH 6.74), SDS 0.5%, acido etilendiamminotetracetico (EDTA) 5 mM, inibitore di proteasi (PIC, cat. 539133, Calbiochem) 1:100 e inibitore delle fosfatasi (PhosSTOP, cat. 4906845001, Roche) 1M 1:50 per proteggere le proteine dalla proteolisi e dalla fosforilazione.

Terminata la preparazione del tampone di lisi, si è aspirato il terreno dai pozzetti e questi sono stati poi lavati con 1 ml di tampone fosfato salino (PBS). Dopo la rimozione del PBS, sono stati aggiunti 100 µl di tampone di lisi per pozzetto e, aiutandosi con uno scraper, le cellule lisate sono state staccate dal fondo del pozzetto per essere poi inserite in provette da 1,5 ml. Successivamente i lisati ottenuti sono stati sottoposti al saggio BCA per poterne valutare la concentrazione proteica.

5.4 Saggio BCA (BiChinonic Acid)

Ogni campione è stato sottoposto al saggio BCA (BiChinonic Acid) il quale consente di quantificare la concentrazione totale di proteine presenti nel campione. Si sfrutta il valore di assorbanza del campione a 526 nm che, secondo la legge di Lambert-Beer, è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteine nella cuvetta.

In ambiente basico, gli ioni rameici (Cu^{2+}) reagiscono con i gruppi tiolici delle proteine all'interno del campione modificando il loro numero di ossidazione da Cu^{2+} a Cu^+ . Questi ioni sono chelati da due molecole di BCA dando origine a una colorazione violacea, tanto più intensa quanto maggiore è la concentrazione delle proteine nel campione.

Per eseguire il saggio è stato sfruttato un apposito kit (Quantipro™ BCA Assay kit, cat. QPBCA, Sigma-Aldrich) costituito da tre soluzioni: A, B e C. Lo strumento, basandosi sulla curva di

taratura, fornisce un valore di assorbanza dal quale si può ricavare la concentrazione proteica del campione.

5.5 SDS-PAGE e Western Blot

La tecnica SDS-PAGE è ampiamente utilizzata per l'analisi quantitativa di miscele di proteine. Prevede l'impiego di sodio dodecilsolfato (SDS) il quale si lega alle proteine, distrugge le loro interazioni non covalenti permettendo la distensione di esse in catene pressoché lineari e con carica globale negativa proporzionale alla loro massa.

I campioni, a seconda del peso molecolare delle proteine, sono caricati su un gel di poliacrilamide al 6% o al 10% composto da due parti: una parte superiore, detta Stacking gel e una parte inferiore, detta Running gel.

All'interno di una Falcon da 50 ml si è preparato il Running gel (gel di separazione) avente la seguente composizione:

Sequenza componenti	Gel al 6%	Gel al 10%
Acqua MilliQ	5,82 ml	4,82 ml
Running Buffer	2,5 ml	2,5 ml
Acrilammide 40%	1,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
APS	60 µl	60 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Il gel viene colato fra due vetrini con spessore di 1,5 mm attraverso un pipettatore dotato di siringa da 10 ml, viene aggiunto immediatamente isopropanolo fino al bordo del vetrino. Trascorsi circa 20 minuti, tempo necessario affinché il gel polimerizzi, si è preparato in una Falcon da 50 ml lo Stacking gel con seguente composizione:

Sequenza componenti	Gel al 6%	Gel al 10%
Acqua MilliQ	2,8 ml	2,8 ml
Running Buffer	1,25 ml	1,25 ml
Acrilammide 40%	0,81 ml	0,81 ml

SDS 10%	50 μ l	50 μ l
APS	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

Dopo aver colato il gel fra i due vetrini con un pipettatore dotato di una siringa da 10 ml è stato inserito un pettine da 10 pozzetti al fine di creare i pozzetti in cui sono stati poi inseriti i campioni. Terminata la polimerizzazione, il supporto contenente i due vetrini è stato inserito in una camera per elettroforesi con una soluzione denominata Running Buffer, composto da Tris-glicina e SDS.

Nel frattempo, sono stati preparati i campioni di lisato a cui sono stati aggiunti volumi opportuni di Laemmli Sample Buffer 4X e 2X (Bio-Rad). I campioni poi sono stati bolliti per 7 minuti a 96 °C, vortexati e centrifugati. I campioni utilizzati per IP₃R sono invece stati bolliti a 37 °C per un'ora, vortexati e centrifugati. 18 μ g di ciascun campione è stato caricato, affiancato a 5 μ L di marker di pesi molecolari (Bio-Rad) e corso a voltaggio costante.

Dopo la corsa elettroforetica, durante la quale le proteine si separano a seconda del loro peso molecolare, si è proceduto con il trasferimento di esse dal gel a una membrana di nitrocellulosa del kit Mini Transfer Pack (Bio-Rad) sfruttando il programma adatto dell'apparecchio Trans-Blot® Turbo TM (Bio-Rad).

Per verificare che il trasferimento sia avvenuto correttamente e ciascun pozzetto sia stato caricato con la stessa quantità di proteina la membrana viene colorata con Rosso Ponceau 0,1% e le bande sono state osservate visivamente. Le membrane sono state poi lavate con TBS (TRIS Buffer Saline) /0,1%-Tween 20. Terminato questo passaggio, è stato effettuato il Blocking delle membrane con una soluzione composta da latte in polvere 5% (milk 5%) (Skim Milk Powder, cat. 70166, Sigma-Aldrich) in TBS/0,1%-Tween20 per circa un'ora, con lo scopo di impedire i legami aspecifici degli anticorpi primari sulla membrana. Trascorso il tempo necessario per il Blocking, sono stati aggiunti gli anticorpi primari diretti, lasciati in incubazione a 4 °C per la notte, in costante agitazione.

Gli anticorpi primari utilizzati sono riportati in Tabella.

Anticorpo	Specie ospite	Diluizione	N° catalogo	Fornitore
Anti-ATF4	Mouse	1:500	sc-390063	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ATF6	Rabbit	1:500	bs-1634R	Bioss Antibodies
Anti-PERK	Rabbit	1:500	3192	Cell Signalling

Anti-Grp75	Rabbit	1:500	14887-1-AP	Proteintech
Anti-MCU	Rabbit	1:500	26312-1-AP	Proteintech
Anti-VDAC	Mouse	1:500	55259-1-AP	Proteintech
Anti-IP ₃ R	Rabbit	1:200	AB-82747	Immunological Sciences

Il giorno seguente, dopo aver recuperato l'eccesso di anticorpo primario ed effettuato tre lavaggi da 7 minuti con TBS 0,1%-Tween20, sono stati incubati sulle membrane i rispettivi anticorpi secondari preparati 1:5000 in milk al 5% e lasciati in incubazione per 45 minuti, in agitazione a temperatura ambiente. Come anticorpi secondari sono stati utilizzati goat anti-mouse o goat anti-rabbit (entrambi coniugati alla perossidasi di rafano) a seconda della tipologia di anticorpo primario. L'uso dell'anticorpo secondario è finalizzato all'amplificazione del segnale in quanto questo si lega alla porzione costante del primario.

Gli anticorpi secondari utilizzati sono riportati in Tabella.

Anticorpo	Specialità animale	Diluizione	N° catalogo	Fornitore
Anti-Mouse	Goat	1:5000	170-6515	Bio-Rad
Anti-Rabbit	Goat	1:5000	170-6516	Bio-Rad

In seguito, le membrane sono state sottoposte a 3 lavaggi con TBS 0,1%-Tween20. Per lo sviluppo delle membrane è stata preparata una soluzione di sviluppo sfruttando il kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (cat. 34578, Thermo Scientific) costituito da due soluzioni, A e B, da prelevare in egual volume. La perossidasi di rafano coniugata all'anticorpo secondario reagisce con la soluzione di sviluppo generando luminescenza. Per l'acquisizione dei segnali è stato utilizzato lo strumento ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad).

Per la normalizzazione del risultato le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario anti-β-actina, in quanto uno dei principali geni house-keeping indicati in letteratura. L'incubazione ha durata di tre ore, in agitazione a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario anti-mouse, lo sviluppo è stato effettuato come precedentemente descritto. La normalizzazione del segnale della proteina IP₃R è stata effettuata su Ponceau.

Tutte le immagini sono state analizzate e quantificate utilizzando Image Lab 6.1 (Bio-Rad), software che fornisce i valori di intensità delle bande ottenute al ChemiDoc™.

5.6 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica che si basa sull'utilizzo di anticorpi primari e anticorpi secondari marcati con molecole fluorescenti le quali, grazie all'interazione antigene-anticorpo, possono essere visualizzate in microscopia al fine di poter visualizzare proteine presenti nelle cellule.

50000 astrociti primari trasfettati o 10000 Hela esprimenti ER-RFP, 10nmEML e 20nm EML sono state seminate su vetrini da 13mm (precedentemente lavati con etanolo) che sono stati poi inseriti in piastre multiwell da 24 pozzetti. Dopo 48 ore di incubazione, le cellule sono state fissate sui vetrini in PAF (paraformaldeide) al 4% per 15 minuti.

Sono stati effettuati 3 lavaggi in tampone fosfato salino (PBS) 1X (300 µl/pozzetto) a cui è seguita la fase di permeabilizzazione con Triton X-100 0,1% in PBS 1X (300 µl/pozzetto) per 7 minuti a temperatura ambiente. Questo passaggio facilita l'ingresso dell'anticorpo all'interno delle cellule. Al fine di ridurre i legami aspecifici, segue la fase di blocking con gelatina 0,1% (300 µl/pozzetto) per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente.

Si è proceduto poi con la preparazione dell'Antibody buffer composto da gelatina 0,03% e Triton X-100 0,01% in cui sono stati diluiti i seguenti anticorpi:

Anticorpo	Specialità animale	Diluizione	N° catalogo	Fornitore
Anti-panCaNA α	Rabbit	1:100	2614	Cell Signalling
Anti-eIF2 α	Rabbit	1:200	AHO0802	Invitrogen
Anti-PERK	Rabbit	1:200	3192	Cell Signalling

Il trattamento è avvenuto o/n a 4°C (180 µl/pozzetto).

Il giorno seguente, dopo la rimozione dell'anticorpo primario, sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS 1X (300 µl/pozzetto) da 5 minuti a temperatura ambiente. L'anticorpo secondario biotinilato è stato diluito 1:200 in PBS, aggiunto ai pozzetti (180 µl/pozzetto) e lasciato incubare per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente. Seguono 3 lavaggi in PBS 1X da 5 minuti a temperatura ambiente. Al fine di amplificare il segnale è stata sfruttata Streptavidina Alexa Fluor 633 (Invitrogen) 1:200 in PBS 1X (180 µl/pozzetto) per 30 minuti a 4°C. L'associazione Biotina-Streptavidina consente

l'amplificazione del segnale. Dopo aver eseguito 3 lavaggi in PBS 1X da 5 minuti, è stato incubato DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo) 1:5000 in PBS 1X per 10 minuti a temperatura ambiente. Si tratta di un colorante organico fluorescente il quale lega fortemente regioni di DNA ricche in sequenze Adenina-Timina consentendo di visualizzare i nuclei delle cellule. Dopo aver effettuato 3 lavaggi in PBS 1X da 10 minuti, si è proceduto al montaggio dei vetrini con montante (5 μ l/vetrino, Fluoroshield 1003648772, Sigma-Aldrich) sul vetrino porta-oggetti. I vetrini porta-oggetto sono stati poi conservati a 4 °C in modo che il montante si solidificasse. Le immagini sono state acquisite mediante Leica TCS SP8 DIVE Multiphoton Microscope e successivamente analizzate con il pacchetto Fiji del software ImageJ v. 1.52p.

5.7 Misurazione del Ca²⁺ signalling nel mitocondrio

Vetrini da 24 mm di diametro sono stati posizionati in una multiwell da 6 pozzetti e trattati con poli-L-lisina 0.1 mg/ml (cat. 25988-63-0, Sigma-Aldrich) per favorire l'adesione delle cellule al vetro. Sono stati piastrati 15x10³ astrociti ippocampali primari ACN-Ctr o ACN-KO per pozzetto in un unico spot, al centro del vetrino. Le cellule, dopo 48 ore dalla piastratura, sono state incubate per 30 minuti al buio a temperatura ambiente con la sonda Mt-fura-2 (*Pendin et al, 2019*)⁶⁰ in presenza di Pluronic F127 0.005% (cat. No P6867, Life Technologies, Milan, Italy) e sulfinpirazone 10 μ M (cat. No S9509, Sigma) in una soluzione KRB (125mM NaCl, 5mM KCl, 1mM Na₃PO₄, 1mM MgSO₄, 5.5mg glucosio, 20mM HEPES, pH 7.4) addizionata con 2 μ M di CaCl₂. Dopo un lavaggio in KRB al fine di consentire la de-esterificazione, ciascun vetrino è stato montato in una camera di acquisizione e posizionato nel microscopio ad epifluorescenza Leica DMI6000B, equipaggiato con un obiettivo S Fluor 40X/1.3, utilizzando l'olio Plan Neofluar 403 per l'immersione dell'obiettivo (Zeiss). Le cellule sono state eccitate alternativamente a 340/380nm dal monocromatore Polichrome V (Till Photonics, Munich, Germany) e il segnale di fluorescenza è stato catturato con una CDD camera (Hamamatsu, Japan) utilizzando un filtro per 510nm. Lo stimolo (100 μ M di ATP) è stato fornito dopo 30s di registrazione del segnale basale, il quale è stato poi seguito per i successivi 300s dallo stimolo. I segnali di fluorescenza sono stati acquisiti con il software MetaFluor (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Per il confronto delle dinamiche del Ca²⁺ mitocondriale, misurate come ampiezza dell'aumento di Ca²⁺ rispetto al basale, i valori Mt-fura-2 sono stati normalizzati utilizzando la formula $\Delta R/R_0$.

5.8 Analisi statistica

Per l'analisi statistica e le relative rappresentazioni grafiche è stato utilizzato il programma GraphPad Prism v.7 per Mac OS X, GraphPad Software (La Jolla, California, USA). I dati ottenuti sono espressi come media \pm SEM. Per il confronto fra due campioni è stato utilizzato il T-Test di Student (two-tailed unpaired), mentre per confrontare più gruppi sperimentali è stato sfruttato oneway ANOVA. I valori di n e le loro medie sono indicati nelle legende delle figure. Le differenze sono state considerate significative per p value ≤ 0.05 (*p $\leq 0,05$, **p $\leq 0,01$, ***p $\leq 0,001$, ****p $\leq 0,0001$).

Bibliografia

1. Encyclopedia of Neuroscience. ScienceDirect
<http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780080450469/encyclopedia-of-neuroscience>.
2. Gradisnik, L. & Velnar, T. Astrocytes in the central nervous system and their functions in health and disease: A review. *World J. Clin. Cases* **11**, 3385–3394 (2023).
3. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **119**, 7–35 (2010).
4. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000) | Neurochemical Research. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007677003387>.
5. Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* **32**, 421–431 (2009).
6. Allen, N. J. & Eroglu, C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* **96**, 697–708 (2017).
7. Cabezas, R. et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson’s disease. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 211 (2014).
8. Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S. A. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* **26**, 523–530 (2003).
9. Koehler, R. C., Gebremedhin, D. & Harder, D. R. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J. Appl. Physiol.* **100**, 307–317 (2006).
10. Beard, E., Lengacher, S., Dias, S., Magistretti, P. J. & Finsterwald, C. Astrocytes as Key Regulators of Brain Energy Metabolism: New Therapeutic Perspectives. *Front. Physiol.* **12**, (2022).
11. Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Wegrzynowicz, M., Lee, E., Bowman, A. B. & Aschner, M. Role of Astrocytes in Brain Function and Disease. *Toxicol. Pathol.* **39**, 115–123 (2011).
12. Giovannoni, F. & Quintana, F. J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends Immunol.* **41**, 805–819 (2020).
13. Verkhratsky, A. & Nedergaard, M. Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* **98**, 239–389 (2018).
14. Marina, N. et al. Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow. *Nat. Commun.* **11**, 131 (2020).
15. Semyanov, A., Henneberger, C. & Agarwal, A. Making sense of astrocytic calcium signals — from acquisition to interpretation. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 551–564 (2020).
16. García-Cáceres, C. et al. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat. Neurosci.* **22**, 7–14 (2019).
17. Santello, M., Toni, N. & Volterra, A. Astrocyte function from information processing to

cognition and cognitive impairment. *Nat. Neurosci.* **22**, 154–166 (2019).

- 18.** Klee, C. B., Crouch, T. H. & Krinks, M. H. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 6270–6273 (1979).
- 19.** Muramatsu, T., Giri, P. R., Higuchi, S. & Kincaid, R. L. Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 529–533 (1992).
- 20.** Rusnak, F. & Mertz, P. Calcineurin: Form and Function. *Physiol. Rev.* **80**, 1483–1521 (2000).
- 21.** Goto, S., Matsukado, Y., Mihara, Y., Inoue, N. & Miyamoto, E. The distribution of calcineurin in rat brain by light and electron microscopic immunohistochemistry and enzyme-immunoassay. *Brain Res.* **397**, 161–172 (1986).
- 22.** Vinadé, L., Gonçalves, C. A., Wofchuk, S., Gottfried, C. & Rodnigt, R. Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and in astrocyte cultures from the rat. *Dev. Brain Res.* **104**, 11–17 (1997).
- 23.** Lim, D., Ronco, V., Grolla, A. A., Verkhatsky, A. & Genazzani, A. A. Glial Calcium Signalling in Alzheimer’s Disease. in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 167 (eds. Nilius, B. et al.) 45–65 (Springer International Publishing, Cham, 2014). doi:10.1007/112_2014_19.
- 24.** Lim, D. et al. Calcium Signalling Toolkits in Astrocytes and Spatio-Temporal Progression of Alzheimer’s Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **13**, 359–369 (2016).
- 25.** Tapella, L. et al. Deletion of calcineurin from GFAP-expressing astrocytes impairs excitability of cerebellar and hippocampal neurons through astroglial Na⁺/K⁺ ATPase. *Glia* **68**, 543–560 (2020).
- 26.** Kuno, T. et al. Distinct Cellular Expression of Calcineurin A α and A β in Rat Brain. *J. Neurochem.* **58**, 1643–1651 (1992).
- 27.** Furman, J. L. & Norris, C. M. Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond. *J. Neuroinflammation* **11**, 158 (2014).
- 28.** From pathology to physiology of calcineurin signalling in astrocytes. <https://cyberleninka.ru/article/n/from-pathology-to-physiology-of-calcineurin-signalling-in-astrocytes/viewer>.
- 29.** Shaw, J.-P. et al. Identification of a Putative Regulator of Early T Cell Activation Genes. *Science* **241**, 202–205 (1988).
- 30.** Crabtree, G. R. & Olson, E. N. NFAT Signaling: Choreographing the Social Lives of Cells.

Cell **109**, S67–S79 (2002).

- 31.** Bendickova, K., Tidu, F. & Fric, J. Calcineurin–NFAT signalling in myeloid leucocytes: new prospects and pitfalls in immunosuppressive therapy. *EMBO Mol. Med.* **9**, 990–999 (2017).
- 32.** Lim, D., Tapella, L., Dematteis, G., Talmon, M. & Genazzani, A. A. Calcineurin Signalling in Astrocytes: From Pathology to Physiology and Control of Neuronal Functions. *Neurochem. Res.* **48**, 1077–1090 (2023).
- 33.** Sans, M. D. & Williams, J. A. Calcineurin is required for translational control of protein synthesis in rat pancreatic acini. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **287**, C310–C319 (2004).
- 34.** Tosello, V. et al. Calcineurin complex isolated from T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells identifies new signaling pathways including mTOR/AKT/S6K whose inhibition synergize with calcineurin inhibition to promote T-ALL cell death. *Oncotarget* **7**, 45715 (2016).
- 35.** Dematteis, G. et al. Calcineurin Controls Expression of EAAT1/GLAST in Mouse and Human Cultured Astrocytes through Dynamic Regulation of Protein Synthesis and Degradation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2213 (2020).
- 36.** Dematteis, G. et al. Calcineurin Controls Cellular Prion Protein Expression in Mouse Astrocytes. *Cells* **11**, 609 (2022).
- 37.** Bond, S., Lopez-Lloreda, C., Gannon, P. J., Akay-Espinoza, C. & Jordan-Sciutto, K. L. The Integrated Stress Response and Phosphorylated Eukaryotic Initiation Factor 2 α in Neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **79**, 123–143 (2020).
- 38.** Bollo, M. et al. Calcineurin Interacts with PERK and Dephosphorylates Calnexin to Relieve ER Stress in Mammals and Frogs. *PLOS ONE* **5**, e11925 (2010).
- 39.** Walter, P. & Ron, D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* **334**, 1081–1086 (2011).
- 40.** Malhotra, J. D. & Kaufman, R. J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 716–731 (2007).
- 41.** Hetz, C. & Papa, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell* **69**, 169–181 (2018).
- 42.** Hillary, R. F. & FitzGerald, U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J. Biomed. Sci.* **25**, 48 (2018).
- 43.** Verfaillie, T. et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* **19**, 1880–1891 (2012).
- 44.** Lim, D. et al. Ca²⁺ handling at the mitochondria-ER contact sites in neurodegeneration. *Cell Calcium* **98**, 102453 (2021).

45. Szabadkai, G. et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* **175**, 901–911 (2006).
46. Rizzuto, R., Simpson, A. W. M., Brini, M. & Pozzan, T. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* **358**, 325–327 (1992).
47. The ER-mitochondria interface, where Ca²⁺ and cell death meet - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416023000556?via%3Dihub>.
48. Rowland, A. A. & Voeltz, G. K. Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 607–615 (2012).
49. Csordás, G. et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* **174**, 915–921 (2006).
50. Marchi, S. et al. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Communication Through Ca²⁺ Signaling: The Importance of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs). in *Organelle Contact Sites* (eds. Tagaya, M. & Simmen, T.) vol. 997 49–67 (Springer Singapore, Singapore, 2017).
51. Cieri, D. et al. SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death Differ.* **25**, 1131–1145 (2018).
52. Vallese, F. et al. An expanded palette of improved SPLICS reporters detects multiple organelle contacts in vitro and in vivo. *Nat. Commun.* **11**, 6069 (2020).
53. Neilson, J. R., Winslow, M. M., Hur, E. M. & Crabtree, G. R. Calcineurin B1 Is Essential for Positive but Not Negative Selection during Thymocyte Development. *Immunity* **20**, 255–266 (2004).
54. Gregorian, C. et al. Pten Deletion in Adult Neural Stem/Progenitor Cells Enhances Constitutive Neurogenesis. *J. Neurosci.* **29**, 1874–1886 (2009).
55. Verkhatsky, A., Rodrigues, J. J., Pivoriunas, A., Zorec, R. & Semyanov, A. Astroglial atrophy in Alzheimer’s disease. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **471**, 1247–1261 (2019).
56. Tapella, L. et al. Deletion of calcineurin from astrocytes reproduces proteome signature of Alzheimer’s disease and epilepsy and predisposes to seizures. *Cell Calcium* **100**, 102480 (2021).
57. Dematteis, G. et al. Proteomic analysis links alterations of bioenergetics, mitochondria-ER interactions and proteostasis in hippocampal astrocytes from 3xTg-AD mice. *Cell Death Dis.* **11**, 1–16 (2020).
58. Dematteis, G. et al. ER-mitochondria distance is a critical parameter for efficient mitochondrial Ca²⁺ uptake and oxidative metabolism. 2024.07.24.604907 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.07.24.604907> (2024).
59. Gavet, O. & Pines, J. Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to

Mitosis. *Dev. Cell* **18**, 533–543 (2010).

- 60.** Pendin, D. et al. A Synthetic Fluorescent Mitochondria-Targeted Sensor for Ratiometric Imaging of Calcium in Live Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 9917–9922 (2019).
- 61.** Quirós, P. M. et al. Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *J. Cell Biol.* **216**, 2027–2045 (2017).
- 62.** Wu, Y. et al. Unfolded proteins in the mitochondria activate HRI and inhibit mitochondrial protein translation. *Cell. Signal.* **123**, 111353 (2024).
- 63.** Genazzani, A. A., Carafoli, E. & Guerini, D. Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 5797–5801 (1999).
- 64.** Lim, D., Bertoli, A., Sorgato, M. C. & Moccia, F. Generation and usage of aequorin lentiviral vectors for Ca²⁺ measurement in sub-cellular compartments of hard-to-transfect cells. *Cell Calcium* **59**, 228–239 (2016).
- 65.** Csordás, G. et al. Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Mol. Cell* **39**, 121–132 (2010).

Ringraziamenti

Non è semplice ringraziare, in poche righe, tutte le persone che mi hanno accompagnato in questi cinque lunghi anni: chi con una collaborazione costante, chi con un supporto morale, chi con consigli, suggerimenti o parole di incoraggiamento.

In primis, voglio ringraziare la mia relatrice, la Prof.ssa Tapella Laura per avermi accolta nel suo laboratorio, per avermi sempre seguito con pazienza e per avermi motivato nei momenti di sconforto. Grazie per il tempo che mi ha dedicato e per tutte le conoscenze che mi ha trasmesso. Ringrazio anche il Prof. Lim Dmitry, sempre pronto a dare un consiglio. Un grazie va anche alla Dott.ssa Dematteis Giulia per aver risolto ogni mio dubbio ogni qualvolta ne avessi uno, grazie per la pazienza che hai sempre avuto con me. Un ringraziamento sincero va anche a Elisa e Justyna, siete persone da ammirare per l'entusiasmo e la dedizione che mettete nel lavoro in laboratorio, oltre che persone di cuore, sempre disponibili.

Il mio più sentito ringraziamento va alla mia famiglia, la cosa più importante che ho, senza il vostro supporto non sarei arrivata qui. Un grazie speciale va a mamma e papà a cui dedico questo mio traguardo. Il vostro sacrificio mi ha permesso di arrivare a questo giorno che spero sia per voi indimenticabile. Grazie per aver sempre avuto le parole giuste per aiutarmi ad esempio quando, presa dallo sconforto e dall'ansia, dicevo di non sapere niente il giorno prima degli esami oppure quando pensavo di voler mollare tutto. Spero un giorno di crescere i miei figli esattamente come avete fatto voi. Grazie per tutto quello che mi avete insegnato, se ad oggi sono come sono è solo merito vostro. Spero siate fieri di me. Grazie anche a mio fratello Lorenzo, siamo il sole e la luna ma nonostante tutte le divergenze devi sapere che su di me puoi e potrai sempre contare.

Grazie ai miei carissimi nonni, Gina e Franco. Nonostante i 150 km che ci separano è come se vivessi di fianco a voi. Grazie nonna per il calore, la comprensione e la motivazione che mi riesci a dare durante le nostre chiamate giornaliere. Non sai quanto vorrei essere più vicino per venire a trovarti sempre. Grazie nonno per le risate che mi fai fare, hai visto che la tua "dottoranda" si è laureata finalmente. Prometto che metterò la statuetta che mi hai regalato sulla scrivania del mio primo lavoro e firmerò con la tua penna il mio primo contratto.

Grazie anche alle due stelle che brillano in cielo, nonna Luciana e nonno Rino. Un grazie speciale a voi che mi avete cresciuto, siete sempre nel mio cuore. So che se foste stati qui oggi sareste stati super fieri di me.

Un ringraziamento speciale va alle mie cugine, Alice, Alessia e Giulia. Ali, sei la sorella che non ho mai avuto, grazie per avermi sempre sostenuta in questo percorso, a volte ci hai creduto più tu di me. Potrai sempre contare su di me, non solo per i consigli da farmacista. Alessia e Giulia grazie perché mi fate passare le domeniche in modo spensierato quando vengo a Bergamo. Spero che un giorno arriverà anche la vostra di laurea, io ci sarò.

Grazie ai miei zii, Marzia, Silvia, Paolo, Manuel e Ilaria (una zia acquisita) perché anche voi, nonostante a volte non capivate cosa stessi facendo fra tirocinio, tesi ed esami avete sempre creduto in me.

Un enorme grazie va alle mie amiche di una vita, Martina, Martina, Beatrice, Nicole, Rebecca e Chiara per avermi sempre sostenuta e per avermi fatto passare delle sere di spensieratezza dopo una settimana di studio o di lavoro. Spesso lo spazio e il tempo ci ostacolano, ma abbiamo dimostrato in questi anni che si può rimanere vicine anche senza esserlo fisicamente. Spero che ognuna di voi realizzi i propri sogni.

Non posso non ringraziare tutti i miei compagni di corso, in particolare Alessia, Sara, Alessia, Marta, Samuel con cui ho condiviso questi anni. Un grazie speciale va ad Alessia, mia compagna di viaggi per quattro anni, ci siamo sostenute prima e dopo degli esami esultando per le promozioni e consolandoci per le bocciature. Grazie anche ad Alessandra, mia coinquilina, i nostri sei mesi di convivenza sono stati brevi ma intensi. Un grazie per le serate a confidarci, a sostenerci e a consolarci quando tutto sembrava nero.

Infine, ringrazio la Dott.ssa Bernini Maria per avermi permesso di svolgere il tirocinio nella sua farmacia e il Dott. Fierli Andrea per avermi seguito con pazienza. Mi sento di ringraziare tutti coloro che lavorano alla Farmacia Orti perché in quei tre mesi quando tornavo a casa la sera avevo un entusiasmo infinito. Ringrazio anche la Dott.ssa Savi Maria Laura e tutte le farmaciste dell'Ospedale di Alessandria perché l'esperienza in farmacia ospedaliera mi ha fatto capire qual è probabilmente il mio sogno nel cassetto. Un ringraziamento sentito va a Giorgia, Roberta e Silvia. Mi avete preso sotto la vostra ala, mi avete insegnato tanto, siete state colleghe e amiche.

