

Workshop teorico-pratico

La microscopia confocale nello studio dei mitocondri

23-24 ottobre 2014, Università di Urbino

I mitocondri: breve stato dell'arte

E. Barbieri

Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

E-mail: elena.barbieri@uniurb.it

Il mitocondrio non può essere considerato solo come la centralina energetica delle cellule. Partendo dagli studi evolutivi di Lynn Margulis¹ "On the Origin of Mitosing Cells" e quindi dalla teoria endosimbionta per cui i mitocondri si introducono nella cellula come organismi procarioti esterni, circa 1,5 miliardi di anni addietro, si prendono in esame le evidenze più recenti riguardo la biologia dei mitocondri.

I mitocondri nelle cellule non sono unità discrete a se stanti come spesso descritti nei testi, la morfologia mitocondriale è, infatti, complessa, dinamica e continuamente rimodellata dagli eventi di fusione e fissione per rispondere a specifiche esigenze cellulari. Nei mitocondri si evince l'esistenza di una struttura simile ad un reticolo costituito da un sistema continuo di membrane mitocondriali. La presenza di una struttura reticolare che interagisce con gli organelli come il citoscheletro o il reticolo endoplasmatico, presente soprattutto nelle cellule ad alta richiesta energetica, potrebbe avere un considerevole vantaggio per soddisfare le richieste energetiche per il mantenimento dell'omeostasi metabolica cellulare nei vari distretti cellulari. Il ciclo vitale dei mitocondri prevede quindi periodi di fusione e fissione che avvengono sia a livello della membrana mitocondriale interna che di quella esterna e sono controllati da GTPasi appartenenti alla famiglia delle dinamine. La vita di un mitocondrio è di circa 10 giorni: dopo un evento di fissione, i mitocondri entrano in una condizione di stato solitario nel quale sono più lunghi di circa ~20-volte rispetto al periodo di fusione.² In questa fase può avvenire mitocondriogenesi, in genere in seguito ad un

adattamento energetico come ad esempio in seguito a digiuno o esercizio fisico. Quando un mitocondrio è vitale, mantiene un potenziale di membrana polarizzato e può fondere con un altro mitocondrio. Tuttavia, se il mitocondrio depolarizza, perde di funzionalità, rimarrà solitario e potrà essere digerito tramite i lisosomi (mitofagia).

I mitocondri noti principalmente per svolgere una funzione critica nel mantenimento dei depositi energetici cellulari, sono altresì coinvolti in diversi importanti meccanismi molecolari, quali la termogenesi, i processi di apoptosi cellulare e come sito di eventi di trasduzione dei segnali cellulari, i quali possono aiutare nel coordinare l'espressione dei geni nucleari e mitocondriali stessi. Un malfunzionamento mitocondriale, per disfunzioni o mutazioni a carico del DNA mitocondriale (mtDNA) può essere associato o la causa di alcuni processi coinvolti nell'insorgenza di patologie croniche non trasmissibili quali la sindrome metabolica, il diabete, l'obesità e il cancro ed anche nell'invecchiamento.

In maniera particolare la restrizione calorica e l'esercizio fisico regolare e costante possono essere importanti strategie che permettono di controllare l'assunzione di energia e promuovere la spesa energetica tramite un incremento del metabolismo ossidativo.^{3,4} Infatti, l'esercizio aerobico è riconosciuto come uno dei migliori strumenti per potenziare non solo la performance fisica, ma anche portare benefici per la salute e prevenire e trattare molte delle patologie croniche degenerative dette "moderne".

Bibliografia

1. Lynn Sagan (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14 (3): 255-274.
2. Hales, K. G. (2010) Mitochondrial Fusion and Division. *Nature Education* 3(9):12.
3. Martin-Montalvo A. and Cabo R.D. (2013) Mitochondrial metabolic reprogramming

- induced by calorie restriction. *Antioxid Redox Signal* 20;19(3): 310-20.
4. Barbieri E., Sestili P., Vallorani L., Guescini M., Calcabrini C., Gioacchini A. M., Annibalini G., Lucertini F., Piccoli G., and Stocchi V. (2013) Mitohormesis in muscle cells: a morphological, molecular, and proteomic approach. *Muscles Ligaments Tendons J* 3(4): 254-266.

I fluorocromi mitocondriali

B. Canonico

DiStEVA, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

E-mail: barbara.canonico@uniurb.it

L'analisi della funzione mitocondriale può essere eseguita mediante numerosi fluorocromi. La caduta del potenziale di membrana può essere rilevata, sia al citofluorimetro che in microscopia a fluorescenza e confocale, grazie a coloranti cationici lipofilici; i diversi fluorocromi, essendo carichi elettricamente, risentono del potenziale della membrana plasmatica oltre che di quello mitocondriale. La necessità di mantenere l'integrità cellulare sconsiglia l'uso di tecniche di fissazione e/o permeabilizzazione quando si utilizzino fluorocromi la cui permanenza a livello mitocondriale dipende dal metabolismo mitocondriale stesso. Questi ultimi (JC-1, TMRE, ecc) possono essere considerati marcatori della funzionalità del mitocondrio, mentre altre sonde fluorescenti in grado di legare i mitocondri indipendentemente dallo stato energetico e dal loro potenziale di membrana, sono considerati marcatori di massa/numero (Mitotracker, NAO, ecc). Nelle cellule vitali con elevato potenziale di membrana, JC-1 si localizza a livello della membrana mitocondriale sotto forma di aggregati a fluorescenza rossa (gli aggregati reversibili si formano in presenza di un elevato numero di molecole vicine). Al contrario, nelle cellule dove è avvenuta una caduta del potenziale di membrana, il colorante rimane in forma monomeric a livello citoplasmatico, dando una fluorescenza verde diffusa. La tetrametilrodamina etil estere (TMRE) è un colorante cationico che da un forte segnale di fluorescenza, esibendo un modesto legame aspecifico e bassa tossicità. Il TMRE è un marcatore solubile alle membrane e si accumula all'interno dei mitocondri in base al loro $\Delta\Psi$, viene eccitato a 488 nm ed emette fluorescenza a 580 nm. Massa mitocondriale: questo parametro deve essere studiato in quanto è un marcatore

dell'integrità della cellula e deve rimanere relativamente costante durante le analisi. Esistono anche in questo caso più sonde fluorescenti, una di queste è rappresentata dall'arancio di nonil-acridina (NAO), capace di legarsi alle cardiolipine della membrana mitocondriale interna. Il Mitotracker Green FM (MT) è un colorante che diffonde passivamente attraverso la membrana plasmatica e si accumula all'interno dei mitocondri attivi, misurandone la massa dei mitocondri; esibisce fluorescenza verde.

La microscopia confocale applicata allo studio dei mitocondri in cellule e tessuti

C. Ciacci, P. Ambrogini, S. Burattini

DiStEVA, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

E-mail: caterina.ciacci@uniurb.it

I mitocondri sono organelli dinamici, coinvolti in molte funzioni cellulari, tra cui l'attivazione dell'apoptosi, l'autofagia, il controllo del metabolismo e il signalling intracellulare. Essi partecipano a vari processi quali lo sviluppo, la progressione dei tumori, la neurodegenerazione e l'invecchiamento, e vi sono evidenze sempre crescenti dell'esistenza di un legame stretto tra disfunzioni mitocondriali e malattie umane. I mitocondri rispondono continuamente alle variazioni sia di disponibilità di substrati che di fabbisogno energetico cellulare, così da mantenere costanti i livelli intracellulari di ATP; si va affermando l'idea che la fosforilazione reversibile di proteine mitocondriali svolga un ruolo fondamentale in questo controllo metabolico, ma le vie di signalling coinvolte sono ancora poco conosciute.

La microscopia confocale consente l'analisi dell'integrità/funzionalità mitocondriale attraverso l'impiego di molteplici fluorocromi disponibili in commercio.

Per l'analisi del potenziale di membrana ($\Delta\Psi$) abbiamo utilizzato: 1) il 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolcarbocianina ioduro (JC-1), fluorocromo ampiamente adottato in studi sull'apoptosi per monitorare lo stato dei mitocondri; 2) la tetrametilrodaminaetilestere (TMRE), marcatore solubile che si accumula all'interno dei mitocondri in base al loro $\Delta\Psi$, definendone il loro stato funzionale; 3) il CMX-Ros (Mitotracker red), il cui accumulo nei mitocondri è dipendente dal loro potenziale di membrana.

Per lo studio della massa/numero mitocondriale, importante al fine di rivelare l'integrità della cellula, sono disponibili diverse sonde fluorescenti. Allo scopo abbiamo utilizzato: 1) il 10-N-nonil-arancio di acridina (NAO), capace di legare la membrana mitocondriale interna, a livello delle cardiolipine, indipendentemente dallo stato energetico e dal potenziale di membrana mitocondriale; 2) il Mitotracker Green FM (MTG), colorante che diffonde passivamente attraverso la membrana plasmatica e si accumula all'interno dei mitocondri attivi.

I fluorocromi mitocondriali sono stati utilizzati in cellule vive e non fissate isolate dalla ghiandola digestiva di mitilo *Mytilus galloprovincialis* e in mioblasti di topo C2C12 dopo fissazione in paraformaldeide 4% (PFA). Sono stati, inoltre, utilizzati su sezioni coronali di 50 µm di spessore ottenute mediante taglio al vibratomo di cervello di ratto, fissato in PFA 4% immediatamente dopo il prelievo.

I risultati ottenuti suggeriscono di non fissare e/o permeabilizzare il campione quando si desidera studiare funzionalità e/o integrità mitocondriali, in quanto sia le cellule che le sezioni sottoposte a procedura di fissazione non hanno fornito una marcatura specifica.

Sonde e anticorpi fluorescenti

G. Mazzini

IGM-CNR e Dipartimento di Biologia e Biotecnologie
"Lazzaro Spallanzani", Università degli Studi di Pavia,
Pavia

E-mail: mazzi@igm.cnr.it

La microscopia in fluorescenza (sia convenzionale che confocale) è oggi supportata da una varietà di marcatori che consentono ai ricercatori che operano nel campo della biologia cellulare di poter esplorare gran parte dei componenti cellulari. Per poterlo fare al meglio è importante conoscere in dettaglio le caratteristiche chimico-fisiche dei marcatori per poterli al meglio adeguare alla altrettanto ampia e tecnologicamente variegata disponibilità strumentale. Per quanto riguarda gli strumenti vi è una continua evoluzione condizionata principalmente dalla disponibilità di nuove sorgenti di luce (dalle lampade ai laser ed oggi i diodi ad alta emissione) ed è fondamentale conoscere le specifiche della parte ottica di illuminazione/emissione per poter sfruttare al meglio le prestazioni analitiche di ogni strumento. La qualità di quanto osserveremo al microscopio a fluorescenza sarà frutto della perfetta combinazione

delle prestazioni strumentali con la nostra capacità di aver scelto il marcatore(i) più idoneo ed averlo utilizzato al meglio sul campione.

Per semplicità didattica possiamo dire che ogni fluorocromo è caratterizzato da una scheda tecnica che potremmo definire come la sua carta di identità. Questa "carta" è abbastanza dettagliata e riporta molte informazioni importanti per l'utilizzatore che deve imparare a leggerle e poi interpretarle. Per far questo è importante anche sapere dove reperire queste informazioni ed è ovvio che quanto si faceva un tempo per via cartacea (libri e manuali) possiamo farlo oggi più facilmente e rapidamente attraverso "internet"...molto utile (anzi indispensabile) in questo senso il sito della "Molecular Probes" dove possiamo consultare un "mitico Handbook" <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>.

Numerosi fluorocromi utilizzati per lo studio dei mitocondri vengono impiegati per la loro spiccata metacromasia in condizioni redox mentre altri sono normalmente utilizzati per marcature specifiche delle componenti mitocondriali. Più in generale possiamo affermare che esistono sonde in grado di definire le strutture (potremmo anche denominarli marcatori morfologici e che sfruttano legami di varia natura da covalenti a ponti di idrogeno) perchè a queste si legano più o meno specificamente. Questi sono certamente utilizzati con finalità meno ambiziose ma con migliore riproducibilità, stabilità ed affidabilità. Altri fluorocromi che potremmo definire più in generale funzionali e le cui caratteristiche spettrofluometriche sono modulate dalle attività funzionali (potenziale di membrana e potenziale redox) sono senz'altro di più ambita applicazione ma con diverse criticità di impiego che vanno certamente conosciute e quindi monitorate per un loro corretto impiego.

Infine un cenno particolare viene riservato agli anticorpi marcati con molecole fluorescenti che meriterebbero un capitolo a parte per la loro grandissima importanza analitica sia in microscopia e forse ancor più in citometria a flusso. Brevi cenni alle due differenti metodologie di marcatura ovvero diretta ed indiretta. Qualche consiglio pratico sulla gestione dei reagenti che sono (quelli direttamente coniugati) sostanzialmente dei complessi chimici abbastanza instabili nel tempo ed occorre conoscere i principali "trucchi" di conservazione ed uso per farli durare nel tempo (considerati anche i costi sempre più elevati).

Mitocondri e linea germinale: il contributo di un sistema inusuale di eredità mitocondriale

M. Passamonti, L. Milani

Dipartimento di Scienze Biologiche Geologiche e Ambientali, Università degli Studi di Bologna

E-mail: marco.passamonti@unibo.it

Il ruolo dei mitocondri nel differenziamento della linea germinale dei metazoi è un aspetto particolarmente poco studiato. Tuttavia vi sono evidenze dirette ed indirette che i mitocondri abbiano un ruolo nella costituzione del plasma germinale. Inoltre, un altro aspetto poco conosciuto è la natura e la dimensione del cosiddetto 'bottleneck mitocondriale', il meccanismo per cui tutti i mitocondri di un nuovo individuo derivano da un piccolissimo gruppo di mitocondri 'fondatori', presenti nelle cosiddette cellule germinali primordiali (PGCs). Non è ancora chiaro se esistano meccanismi specifici per proteggere il DNA mitocondriale delle cellule germinali dagli stress ossidativi derivati dalla colocalizzazione con specie chimiche altamente reattive prodotte dalla fosforilazione ossidativa, un aspetto che è stato messo in relazione, tra l'altro, con i processi di invecchiamento. Il nostro gruppo affronta da qualche anno queste problematiche studiando un modello eteroplasmico inusuale, noto come Doubly Uniparental Inheritance (DUI), presente in alcune specie di molluschi bivalvi. Mentre le femmine DUI sono normalmente omoplasmiche per il genoma mitocondriale di tipo F, i maschi possiedono due tipi di mitocondri, con genoma anche molto diverso (tipo F e tipo M). Il tipo F è trasmesso dall'uovo ed è presente nel tessuto somatico di entrambi i sessi; il tipo M è trasmesso dallo spermatozoo. Le due varianti segregano in maniera sesso-specifica durante lo sviluppo embrionale. La DUI è un modello sperimentale unico per lo studio dei suddetti aspetti, che normalmente viene effettuato mediante l'induzione artificiale dell'eteroplasmia, procedura che può modificare o compromettere i processi sotto esame. Al contrario, nel maschio DUI l'eteroplasmia è naturale e le interazioni nucleo-mitocondri sono il risultato dell'evoluzione. Abbiamo utilizzato, unitamente ad approcci biomolecolari, la microscopia confocale per localizzare la linea germinale durante lo sviluppo embrionale e lo stadio adulto della specie DUI *Ruditapes philippinarum* e la sua colocalizzazio-

ne con il prodotto di un gene mitocondriale sovranumerario esclusivo del genoma di tipo M (la proteina RPHM21). Queste osservazioni sembrerebbero confermare un ruolo del DNA mitocondriale M nella trasmissione dei mitocondri maschili alla progenie e potrebbero suggerire un suo coinvolgimento nella determinazione del plasma germinale maschile nel maschio DUI. Ulteriori analisi sono tuttora in corso per confermare e/o chiarire tale ruolo.

Inoltre, abbiamo effettuato dei saggi di attività mitocondriale in vivo, evidenziando che entrambi i gameti presentano mitocondri attivi e funzionali. I risultati finora ottenuti non sembrerebbero in accordo con le teorie che postulano la soppressione dell'attività mitocondriale dei mitocondri dell'oocita per preservare l'integrità del proprio DNA.

L'associazione dei mitocondri alle unità di rilascio del calcio è controllata da età ed attività muscolare

L. Pietrangelo,¹ P. Ambrogini,² S. Sartini,²
A. Michelucci,¹ H. Kern,³ S. Boncompagni,¹
F. Protasi¹

¹CeSI - Centro Scienze dell'Invecchiamento & DNISC - Dpt. di Neuroscienze, Imaging e Scienze Cliniche: Sez. di Fisiologia e Fisiopatologia; Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti, Italia;

²Dipartimento di Scienze della Terra, della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", Italia

³Ludwig Boltzmann Institute of Electrical Stimulation and Physical Rehabilitation, Vienna, Austria

E-mail: f.protasi@unich.it

È noto che le persone anziane hanno ridotta resistenza alla fatica: uno dei possibili motivi è l'incapacità dei loro muscoli di produrre energia in maniera efficiente. Le fibre muscolari necessitano immediatamente all'arrivo del potenziale d'azione di Ca^{2+} ed ATP per poter attivare e mantenere nel tempo la propria contrazione. Per questo motivo esse sono sotto il controllo diretto di due importanti organelli: a) le unità di rilascio di Ca^{2+} (URC), i siti in cui avviene l'accoppiamento eccitazione-contrazione (EC); e b) i mitocondri, le centrali energetiche della cellula che producono la maggior parte dell'ATP necessario al muscolo attraverso la fosforilazione ossidativa. Interessante il fatto che nel muscolo scheletrico URC e mitocondri sono funzionalmente e strutturalmente collegati tra loro, con l'ingresso di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale

che va a stimolare la catena respiratoria, aumentandone così la produzione di ATP.

In questo studio portato avanti a Chieti, in collaborazione con il Ludwig Boltzmann Institute a Vienna e con l'Università di Urbino, abbiamo ipotizzato: a) che questa inefficienza metabolica dei muscoli nelle persone anziane possa in parte essere dovuta alla compromessa interazione fra mitocondri e URC; e b) che questi cambiamenti siano solo in parte il risultato dell'invecchiamento, ma che l'inattività conseguente ai cambiamenti di stile di vita degli individui anziani rappresenti un cruciale co-fattore da tenere in grande considerazione.

Per testare queste ipotesi abbiamo studiato usando microscopia elettronica (ME): a) biopsie muscolari di soggetti adulti, anziani sedentari ed anziani sportivi; b) muscoli EDL (Extensor Digitorum Longus) di topi adulti, invecchiati ed invecchiati allenati; c) muscoli EDL di ratto adulto temporaneamente denervato prima e dopo aver lasciato al nervo sciatico il tempo di re-innervare le fibre muscolari.

Nei campioni bioptici umani e nei muscoli EDL di topi e ratti abbiamo prima quantificato la frequenza ed il posizionamento sia delle URC che dei mitocondri in ME. I risultati di queste analisi quantitative - in realtà frutto di tre progetti integrati - ha portato ai seguenti risultati:

- a) l'invecchiamento e l'inattività portano ad una diminuzione considerevole del numero sia di URC che dei mitocondri;
- b) l'invecchiamento e l'inattività determinano anche un cambiamento di posizione ed orientamento di una percentuale di URC e mitocondri, con URC che tendono a diventare longitudinali e mitocondri che si spostano dalla corretta posizione alla banda I del sarcomero verso la banda A;
- c) i cambiamenti elencati in a) e b) fanno sì che l'associazione fra URC e mitocondri venga parzialmente compromessa (diminuzione pari a circa 30%);
- d) l'esercizio fisico sia nei soggetti anziani che nei topi allenati è in grado di prevenire molti di cambiamenti legati all'invecchiamento sopra descritti, dato supportato dal recupero analogo che si ottiene nei ratti re-innervati dopo il periodo transitorio di immobilizzazione del muscolo.

In molte pubblicazioni, alterazioni e dis-funzioni mitocondriali sono state proposte come possibile causa della diminuzione della funzionalità muscolare con l'invecchiamento. In questo lavoro abbia-

mo aggiunto un nuovo aspetto che potrebbe influenzare negativamente la capacità dei mitocondri di produrre energia nel muscolo invecchiato: il loro non corretto posizionamento e la loro diminuita associazione ai siti di rilascio di Ca^{2+} nelle fibre scheletriche. Le implicazioni di questi studi potrebbero essere significative: a) l'inattività, e non solo l'invecchiamento, è alla base delle modificazioni a carico del muscolo scheletrico che ne mettono in pericolo la funzionalità; e b) l'attività muscolare è un efficace terapia anti-ageing capace di preservare la corretta interazione fra gli organelli che abbiamo studiato.

Ridistribuzione della proteina mitocondriale AIF nel corso dell'apoptosi

C. Pellicciari

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Lazzaro Spallanzani", Università degli Studi di Pavia

E-mail: pelli@unipv.it

Apoptosis Inducing Factor (AIF) è una proteina di 67 kDa, codificata da un gene che mappa sul cromosoma X (nella regione A6 del topo e Xq25-26 nell'uomo); è altamente conservata, mostrando il 90% di identità nei mammiferi, ed essendo presente ubiquitariamente, in forme AIF-simili, anche nei batteri. Negli eucarioti, AIF possiede un segnale di localizzazione mitocondriale nella sua porzione N-terminale e due sequenze di localizzazione nucleare.

Normalmente, la sua forma matura, parzialmente troncata, di 62 kDa si trova nello spazio intermembrane dei mitocondri, legata alla membrana interna; ha la funzione di regolare l'assemblaggio e la stabilizzazione dei complessi I e III della catena respiratoria, e la sua attività redox è essenziale per il processo di fosforilazione ossidativa. Attraverso l'impiego di tecniche di immunocitochimica in fluorescenza multicolore, la microscopia confocale ha permesso di chiarirne la ridistribuzione dinamica nel corso della morte cellulare regolata (in particolare in apoptosi e parthanatos). In conseguenza della caduta del potenziale di membrana dei mitocondri e per l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale, AIF viene degradato proteoliticamente e la sua forma troncata di 57 kDa passa nel citoplasma e poi nel nucleo, dove se ne riconosce la presenza nelle fasi precoci della morte cellulare regolata. In tali fasi, AIF è coinvolto nella condensazione e emarginazione della

cromatina e, associandosi a ciclofilina A ed alla forma fosforilata dell'istone H2AX, induce la degradazione endonucleasica del DNA cromatinico in frammenti ad alto peso molecolare (> 50 kb). Da questo punto di vista, il rilascio di AIF dai mitocondri può essere considerato come un evento distintivo delle fasi iniziali di apoptosi.

Nelle fasi tardive, invece, AIF esce dal nucleo e passa nel citoplasma, tornando ad essere immunocitochimicamente rilevabile nei mitocondri. La ricomparsa di AIF nei mitocondri dipende da una sua sintesi *de novo*, e può essere interpretata come un meccanismo adattativo volto al recupero della funzionalità mitocondriale.

