

Università degli Studi di Milano
Dottorato in Medicina Molecolare
Curriculum: Genomica, Proteomica e Tecnologie Correlate
(XXIV ciclo)

Tesi di Dottorato
**Il difetto ossidativo mitocondriale e le alterazioni del
DNA mitocondriale in topi transgenici modello animale
della Atassia Spinocerebellare di tipo 1**

Dottorando: Dr. ssa Valeria Lucchini
Tutore: Prof. Giacomo Pietro Comi
Co-tutore: Prof. Maurizio Gualtiero Moggio
Direttore: Ch.mo Prof. Mario Clerici

Matricola R08149

Borsa di studio: Fondazione IRCCS Ca' Granda Osp. Maggiore
Policlinico Milano
Laboratorio di diagnostica morfologica delle malattie neuromuscolari

Anno Accademico: 2010/2011

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	IV
1.1 Atassie spinocerebellari: manifestazioni cliniche e diagnosi differenziale.....	IV
1.2 Genetica della SCA1: relazioni genotipo fenotipo.....	VI
1.3 Degenerazione cerebellare nell'uomo.....	VII
1.4 Modelli transgenici murini di SCA1: pregi e difetti dei modelli esistenti.....	VIII
1.5 Sintesi delle ipotesi patogenetiche.....	IX
1.6 La degenerazione del sistema cerebellare nelle encefalopatie mitocondriali.....	X
2. ABSTRACT.....	XIII
3. OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	1
3.1 Attività ossidativa mitocondriale.....	1
3.2 Alterazioni a carico del DNA mitocondriale a livello delle cellule del Purkinje.....	3
4. MATERIALI E METODI.....	5
4.1 MODELLO ANIMALE.....	5
4.2 Prelievo, congelamento, stoccaggio.....	7
4.3 Istologia ed istochimica.....	7
4.4 Analisi quantitativa delle cellule del Purkinje con difetto enzimatico di COX.....	8
4.5 TUNEL.....	8
4.6 Immunoistochimica.....	9
4.7 Dosaggio enzimi della catena respiratoria mitocondriale.....	10
4.8 Localizzazione ultrastrutturale attività enzimatica COX.....	11
4.8.1 Esame standard:.....	11
4.8.2 Istochimica:.....	12
4.9 Estrazione DNA da tessuto cerebellare.....	13
4.10 Isolamento cellulare da tessuto mediante laser dissettore....	13
4.11 Estrazione DNA da pool di cellule del Purkinje microdisseccate.....	14
4.12 Amplificazione del DNA mitocondriale.....	15
4.13 Analisi del contenuto in mtDNA su PC isolate con micro dissettore laser.....	15
5. RISULTATI.....	17
5.1 Studio morfologico.....	17

5.2	<i>Analisi quantitativa delle cellule del Purkinje con difetto enzimatico di COX.</i>	22
5.3	<i>Analisi quantitativa apoptosi</i>	23
5.4	<i>Studio biochimico</i>	23
5.5	<i>Localizzazione ultrastrutturale attività enzimatica COX</i>	24
5.6	<i>Amplificazione mtDNA da tessuto cerebellare</i>	28
5.7	<i>Isolamento al microdissettore delle cellule del Purkinje</i>	28
5.8	<i>Analisi mutazionale mtDNA</i>	30
5.9	<i>Analisi molecolare del mtDNA</i>	32
5.9.1	<i>Ricerca deplezione mt-DNA</i>	32
5.9.2	<i>Ricerca mutazioni puntiformi mtDNA</i>	37
6.	DISCUSSIONE	38
7.	BIBLIOGRAFIA	46

ABBREVIAZIONI

ADCA: atassie spinocerebellari autosomiche dominanti

Blue: blu di metilene

COX: citocromo c ossidasi

GC: cellule dei granuli

H&E: ematossilina ed eosina

mtDNA: DNA mitocondriale

nDNA: DNA nucleare

PC: cellule del Purkinje

PCR: reazione polimerasica a catena

PoliQ: poliglutamine

SCA1: atassia cerebellare di tipo 1

SDH: succinico deidrogenasi

SNC: sistema nervoso centrale

TG: tricromica di Gomori

TUNEL: terminal deoxinucleotidil transferase-mediated dUTP nick end labelling assay

WT: wild type

1. INTRODUZIONE

1.1 Atassie spinocerebellari: manifestazioni cliniche e diagnosi differenziale

L'inquadramento nosografico delle atassie spinocerebellari è molto complesso. Possono essere classificate in base al tipo di ereditarietà in autosomiche dominanti, autosomiche recessive e sporadiche; Harding (1982) ha proposto una classificazione in tre categorie delle atassie cerebellari autosomiche dominanti (ADCA): tipo I, tipo II e tipo III. Le ADCA tipo I comprendono sindromi quali la atassia spinocerebellare di tipo 1 (SCA1), SCA4, SCA8, SCA10, SCA12, SCA23, SCA25, SCA27, SCA28 e l'atrofia dentatorubropallidoluysiana (DRPLA). Le ADCA di tipo II comprendono sindromi cui si associano maculopatie pigmentarie ed includono la SCA7. Le ADCA tipo III comprendono sindromi atassiche pure e includono la SCA5, SCA6, SCA11, SCA26, SCA29, SCA30 e SCA31 (Whaley 2007).

Le manifestazioni cliniche delle atassie cerebellari autosomiche dominanti (ADCA) tipo I sono complesse ed includono atassia più ulteriori segni neurologici. Lo spettro clinico spazia da puri segni cerebellari ad una costellazione di ulteriori segni quali una sindrome midollare, polineuropatia, coinvolgimento cognitivo, segni oftalmologici cerebellari o sopranucleari, patologia psichiatrica ed epilessia. L'atassia nelle ADCA tipo I si caratterizza per essere un disordine del movimento

volontario per quel che concerne (1) la frequenza di inizio e fine del movimento detta discronometria, (2) l'ampiezza conosciuta come dismetria, (3) la coordinazione di singoli movimenti detta dissinergia, (4) la velocità nel compiere movimenti alternati chiamata disdiadococinesia e (5) la continuità del movimento stesso che si manifesta con tremori d'azione. L'atassia della marcia, assiale e degli arti è spesso la manifestazione più evidente di malattia sebbene il nistagmo, le anomalie dei movimenti saccadici e la disartria siano di solito segni di accompagnamento. (Whaley 2007)

Clinicamente queste sindromi esordiscono con atassia della marcia lentamente progressiva e svariati sintomi addizionali che includono problemi visivi (diplopia), disartria, disfagia, atassia degli arti, spasticità, parkinsonismo, distonia, neuropatia periferica, sindrome delle gambe senza riposo ed urgenza minzionale. Sintomi quali vertigini, problemi nella scrittura e diplopia benché aspecifici possono precedere di anni l'esordio del quadro atassico conclamato (Globas 2008).

Le ADCA vanno poste in diagnosi differenziale con altre condizioni quali gli effetti di alcuni farmaci (es. fenitoina, litio), l'azione di tossine (etanolo, solventi contenenti toluene, metalli quali il manganese), deficienze vitaminiche (E, tiamina, morbo celiaco), endocrinopatie (ipotiroidismo, ipopituitarismo), infezioni (HIV, varicella, Epstein-Barr, prioni), condizioni postinfettive (sindrome di Guillain-Barré, encefalite di Bickerstaff), lesioni strutturali a carico del sistema nervoso centrale (ictus ischemico, emorragie, neoplasie, processi demielinizzanti, ascessi ecc), processi neurodegenerativi (atrofia multisistemica, atassie cerebellari ad ereditarietà recessiva), sindromi paraneoplastiche (da carcinoma a piccole cellule del polmone,

da carcinoma ovarico, da carcinoma mammario) e da condizioni idiopatiche di atassia cerebellare ad esordio tardivo (Whaley 2011).

1.2 Genetica della SCA1: relazioni genotipo fenotipo

Le atassie spinocerebellari dominanti di tipo I sono un gruppo di malattie neurodegenerative geneticamente determinate caratterizzate dall'espansione patologica di una tripletta ripetuta che induce la sintesi di una proteina mutata ricca in poliglutamine. La proteina risulta tossica per la cellula in quanto non riesce ad essere smaltita dai sistemi proteolitici (Duenas 2008). L'accumulo patologico di aggregati della proteina mutata interferisce inoltre con numerose vie metaboliche cellulari in virtù di una possibile funzione tossica intrinseca (Duenas MA 2006).

L'atassia spinocerebellare di tipo 1 (SCA1) appartiene a questo gruppo di malattie ed è determinata dall'espansione patologica di una tripletta ripetuta di CAG nel gene posto sul cromosoma 6 p22-p23 che codifica per l'atassina 1, una proteina ubiquitaria a funzione non del tutto nota (Bradley 2008). Tra le funzioni di regolazione dell'espressione genica accreditate alla forma wild-type della proteina si annovera un ruolo regolatorio nel trasporto nucleo-citoplasma dell'RNA (Irwin 2005).

Generalmente si manifesta in età adulta, tuttavia può manifestarsi anche in gioventù. Ciò può essere imputato al fenomeno dell'anticipazione che implica mutazioni dell'espansione di trinucleotidi che può risultare più lungo in generazioni

seguenti, specialmente se trasmesso per via paterna. La dimensione dell'espansione è inversamente correlata all'età di insorgenza (Whaley 2011).

1.3 Degenerazione cerebellare nell'uomo

Studi autoptici sull'uomo dimostrano che a livello del sistema nervoso centrale si apprezza atrofia cerebellare e delle connessioni pontine e olivari con depauperamento delle cellule del Purkinje. Questo quadro morfologico è presente negli stadi più avanzati della malattia (Clark 1997).

Studi di imaging mostrano infatti che negli stadi precoci l'atrofia cerebellare può essere lieve ed addirittura non visibile l'atrofia bulbo-pontina. Infine, nella SCA1 l'atrofia del troncoencefalo correla con il fenotipo clinico (Guerrini 2004).

Studi di gene profiling in modelli animali di SCA1 hanno dimostrato una down-regolazione genica di prodotti che localizzano sull'albero dendritico delle cellule del Purkinje, uno dei target primari della patologia (Serra 2004).

1.4 Modelli transgenici murini di SCA1: pregi e difetti dei modelli esistenti

Il modello murino più impiegato per lo studio della patogenesi della SCA1 è rappresentato dal topo transgenico B05/82Q. Questo modello murino riproduce la malattia nel topo con le stesse caratteristiche della malattia umana, sia dal punto di vista clinico che anatomopatologico. Tale modello murino si caratterizza per essere portatore del gene umano SCA1 espanso (82Q), sotto il controllo del promoter murino del gene *Pcp2/L7*, specifico per le cellule di Purkinje (Burrigh 1995).

Gli animali eterozigoti della linea B05 transgenica sviluppano i segni della malattia rilevabili all'home cage behavior, a 12 settimane di vita. Le anomalie più precoci riguardano un tremore al capo durante la deambulazione e una minima incoordinazione. L'esame istologico del cervelletto dei topi B05/82Q mostra un normale sviluppo cerebellare fino a 16 giorni dopo la nascita. Le prime alterazioni morfologiche compaiono a 25 giorni dopo la nascita e sono rappresentate da vacuoli citoplasmatici. A 8 settimane compare una lieve gliosi dello strato molecolare. A 15 settimane compaiono atrofia dello strato molecolare e presenza di cellule del Purkinje ectopiche all'interno dello strato molecolare. A 6-7 mesi queste alterazioni descritte divengono più manifeste e risulta conclamato il depauperamento delle cellule del Purkinje. Studi di immunostochimica con anticorpi contro la calbindina dimostrano che le prime alterazioni dell'albero dendritico delle cellule del Purkinje, intese come riduzione delle ramificazioni dendritiche, appaiono a 6 settimane e divengono manifeste a 4 mesi (Clark 1997).

Il gene *Sca1* murino è altamente omologo a quello umano ma possiede solo due ripetizioni di CAG al posto delle 792-826 del gene umano. Il topo transgenico eterozigote A02/30Q, contenente il gene umano normale, non esprime la malattia a più di 36 settimane di età e per tale motivo non risulta essere un buon modello per lo studio della patogenesi della malattia. Al contrario, gli animali omozigoti A02/30Q divengono atassici a 20-24 settimane (Burrigh 1995).

1.5 Sintesi delle ipotesi patogenetiche

Tra le vie metaboliche più studiate implicate nella patogenesi della SCA1 vi sono: il sistema ubiquitina-proteasoma (Ross, 2004) (Park 2005); l'attivazione della via apoptotica estrinseca (Lipinski, 2004); l'alterazione dell'omeostasi al calcio conseguente alla ridotta attività delle molecole con funzione di chaperon, l'azione di stress a carico del reticolo endoplasmico e la downregolazione genica (Serra, 2004; Duenas, 2006). L'accumulo di calcio o l'alterazione della sua compartimentalizzazione intracellulare è da tempo nota per essere potenzialmente citotossica (Orrenius 2003). I mitocondri partecipano attivamente al processo di compartimentalizzazione del calcio al punto da diventare parte integrante della trasmissione del segnale legata al calcio (Petersen 2002). Lo ione calcio regola la permeabilità della membrana mitocondriale esterna provocando il rilascio di proteine pro-apoptotiche (citocromo *c*; fattore inducente l'apoptosi -AIF-) nel citoplasma in risposta a variazioni transitorie della permeabilità della membrana

mitocondriale interna (Duenas 2006) provocando l'attivazione della via apoptotica intrinseca. Questo evento causerebbe un difetto ossidativo elettivamente coinvolgente le cellule del Purkinje in quanto estremamente dipendenti dal metabolismo ossidativo mitocondriale (Tanahashi 2000).

Studi autoptici morfologici sul modello murino di malattia (Clark 1997) hanno dato credito alla teoria della "toxic gain of function" proteica perchè la manifestazione clinica è antecedente la degenerazione massiva neuronale ed inoltre perchè tra le funzioni cellulari compromesse dall'atassina 1 mutata è inclusa la plasticità sinaptica (Duenas MA 2006). Questa teoria conferisce interesse allo studio delle vie metaboliche con le quali la proteina mutata interagisce.

1.6 La degenerazione del sistema cerebellare nelle encefalopatie mitocondriali

Le malattie mitocondriali sono state inizialmente descritte in pazienti affetti da miopatia ad evoluzione discendente e con particolare compromissione della muscolatura extraoculare nelle quali erano anche associati sintomi a carico di diversi altri organi fra i quali il SNC. In alcuni pazienti tale compromissione era particolarmente evidente a livello cerebellare e col tempo alterazioni mitocondriali sono state associate alle cosiddette encefalopatie mitocondriali nelle quali la compromissione muscolare può essere poco rilevante. Una sofferenza mitocondriale delle cellule del Purkinje si verifica quindi spesso nell'ambito delle malattie mitocondriali in alcune delle quali è comune osservare importanti sintomi

prevalentemente cerebellari in pazienti nei quali il difetto ossidativo mitocondriale è peraltro diffusamente presente in numerosi altri neuroni del SNC (Tanahashi 2000, DiMauro 2008). Questa compromissione cerebellare è associata a diverse malattie mitocondriali, sia determinate da alterazioni primitive del DNA mitocondriale (mtDNA) sia determinate da alterazioni secondarie a difetti del DNA nucleare (nDNA) (DiMauro 2008).

Tali alterazioni sono state descritte in geni che codificano per proteine della catena respiratoria, in geni che codificano per proteine strutturali, in geni che codificano per proteine coinvolte nella conservazione ed espressione del mtDNA, in geni che codificano per la sintesi di proteine coinvolte nella biogenesi mitocondriale (Zeviani 2008). Queste proteine sono codificate a livello nucleare, sintetizzate nel citosol sotto forma di precursori proteici e quindi trasportate all'interno dei mitocondri (DiMauro 2008, Zeviani 2008). Generalmente le alterazioni del mtDNA secondarie ad alterazioni del DNA nucleare sono costituite da delezioni multiple o deplezioni (DiMauro 2008). Inoltre, le molecole di mtDNA sono poste all'interno della matrice mitocondriale e sono esposte agli effetti dei radicali liberi generati dalla catena respiratoria e risultano non protetti dall'azione coprente degli istoni a differenza del DNA nucleare. Questo assetto, unitamente con l'alto turnover dell'mtDNA si rende probabilmente responsabile dell'alta frequenza mutazionale. (DiMauro1993). Dato che i mitocondri hanno un ruolo cruciale per quanto riguarda il metabolismo energetico cellulare, una loro disfunzione, probabilmente legata alla presenza di aggregati di poliglutamine, può determinare un deficit ossidativo mitocondriale con elettiva sofferenza delle cellule del Purkinje. Fra le cellule del sistema nervoso centrale (SNC) quelle del Purkinje (PC) sono particolarmente suscettibili ad un

ipotetico danno ossidativo mitocondriale in quanto strettamente dipendenti dal metabolismo mitocondriale. Essendo inoltre numericamente molto inferiori alle altre cellule cerebellari, quelle dei granuli e dei canestri, ed essendo gli unici neuroni di collegamento con le altre strutture encefaliche, una loro alterazione funzionale può determinare conseguenze precocemente evidenti sotto il profilo fenotipico clinico.

Infine, è stato dimostrato che nella SCA12 l'overespressione di *ppp2r2b* e *tws* induca fissione mitocondriale accompagnata da incremento citosolico delle specie attive dell'ossigeno, citocromo c e attività della caspasi 3 (Wang 2011).

La degenerazione cerebellare costituisce inoltre un elemento sufficientemente specifico da identificare definite sindromi mitocondriali, quali la "Infantile Onset Spino-Cerebellar Ataxia", in parte dovuta al gene codificante la elicasi mitocondriale Twinkle (Nikali 2006) o le Atassie Cerebellari Recessive dovute a deficit primario di Coenzima Q10 (Gironi 2004).

2. ABSTRACT

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are a genetically heterogeneous group of cerebellar degenerative disorders, characterized by progressive gait unsteadiness, hand incoordination and dysarthria. The mutational mechanism in spinocerebellar ataxia type1 (SCA1), a dominantly inherited form of SCA, consists of an expanded trinucleotide CAG repeat that encodes a polyglutamine tract in ataxin1.

Mutant SCA1 transgenic mice present pathological cerebellar signs with concomitant progressive Purkinje neuron atrophy and relatively little cell loss, at least in the early stage of life; this evidence suggests that the SCA1 phenotype is not the result of cell death per se, but a possible effect of cellular dysfunction that occurs before neuronal demise.

In the present study we correlated the earliest histopathological changes in both homozygous and heterozygous transgenic SCA1 mice, 2 and 6 months old, to the mitochondrial oxidative metabolism in cerebellar cells.

Our results showed selective Cytochrome c Oxidase (COX) deficiency in Purkinje cells (PC). Analysis on COX-competent and -deficient PC, isolated by laser-microdissector, demonstrated that the observed oxidative dysfunction is related to mitochondrial DNA (mtDNA) depletion.

In conclusion, we provide evidence of a selective oxidative metabolism defect in neuronal PC expressing mutant ataxin. This defect could represent one of the earliest pathogenetic step of the Purkinje cells' suffering in SCA1 disease.

3. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Scopo del progetto è quello di indagare, in topi transgenici modello animale della SCA1, sia l'attività enzimatica ossidativa mitocondriale sia eventuali alterazioni a carico del DNA mitocondriale a livello delle cellule del Purkinje, nell'ottica di contribuire a chiarire la patogenesi di questa malattia.

3.1 Attività ossidativa mitocondriale

E' nota sotto il profilo anatomo patologico una diminuzione del numero delle cellule del Purkinje, unitamente ad una localizzazione ectopica, in pazienti SCA1, senza che però vi siano dati conclusivi riguardo il reale significato patogenetico di questi aspetti. Vi è, infatti, la possibilità che queste alterazioni siano secondarie all'azione di una o più non determinate noxae patogene. Nei topi transgenici SCA1 tali alterazioni morfologiche compaiono alcune settimane dopo la comparsa dei sintomi clinici conclamati e questa considerazione suggerisce come un difetto funzionale energetico a carico delle cellule del Purkinje possa precedere il danno morfologico. Ricordiamo che esistono in letteratura casi di encefalopatie mitocondriali nei quali

alterazioni ossidative mitocondriali sono presenti a carico di cellule del Purkinje con morfologia normale (Tanahashi 2000, Di Mauro 2008).

Abbiamo progettato lo studio in modo da testare l'attività ossidativa mitocondriale in cellule del Purkinje su sezioni di cervelletto ottenute sacrificando topi transgenici (B05/82Q), sia omozigoti che eterozigoti, a due diverse età (2 e 6 mesi). Viene in particolare studiata l'attività enzimatica del complesso IV della catena respiratoria mitocondriale (Citocromo *c* Ossidasi, COX) su sezioni criostatate seriate allestite per identificare le cellule del Purkinje sane e quelle eventualmente in apoptosi. Il confronto fra numero di cellule in apoptosi ed entità dell'eventuale danno ossidativo è indispensabile per stabilire il ruolo patogenetico dell'ipotizzata disfunzione energetica mitocondriale o la sua dipendenza dalla suddetta degenerazione apoptotica.

Nell'ipotesi di testare un'eventuale diffusa alterazione funzionale mitocondriale estesa ad altre cellule encefaliche oltre a quelle del Purkinje, parte dei prelievi autoptici sono utilizzati per eseguire un'analisi biochimica degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale sia su omogenato di cervelletto che di encefalo. I dati ottenuti sono stati analizzati in modo statistico mediante test t di Student.

3.2 Alterazioni a carico del DNA mitocondriale a livello delle cellule del Purkinje

Per quanto riguarda lo studio genetico molecolare bisogna ricordare come il DNA mitocondriale sia suscettibile ad alterazioni dipendenti da difetti genetici del genoma nucleare e come tali difetti possano determinare secondariamente un difetto enzimatico ossidativo (DiMauro 2008).

Le malattie mitocondriali dipendono sia da mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) sia da mutazioni in geni nucleari che interferiscono nella catena respiratoria. Queste malattie, inizialmente descritte in pazienti affetti da patologie muscolari, comprendono pazienti affetti da patologie del SNC fra le quali le alterazioni cerebellari sono spesso evidenti (DiMauro 2008). Le mutazioni a carico del DNA nucleare sono state descritte in geni che codificano per proteine della catena respiratoria, in geni che codificano per proteine strutturali, in geni che codificano per proteine coinvolte nella conservazione ed espressione del mtDNA, in disordini dovuti a difetti enzimatici implicati nelle vie biosintetiche di lipidi o cofattori, in geni che codificano per la sintesi di proteine coinvolte nella biogenesi mitocondriale (Zeviani 2008). Queste proteine sono codificate a livello nucleare, sintetizzate nel citosol sotto forma di precursori proteici e quindi trasportate all'interno dei mitocondri (Di Mauro 2008, Zeviani 2008). Generalmente le alterazioni del mtDNA secondarie ad alterazioni del DNA nucleare sono costituite da delezioni multiple o delezioni (Di Mauro 2008). Inoltre è stato dimostrato che l'accumulo di mutazioni puntiformi dell'mtDNA può modificare il fenotipo clinico di alcune patologie secondarie a mutazioni di geni nucleari. Allo scopo quindi di

identificare se il difetto dell'attività ossidativa riscontrata nelle cellule del Purkinje del topo sia legato ad un' alterazione dell'mtDNA secondaria all'accumulo di poliglutamine (poliQ), abbiamo testato la presenza di delezioni/deplezioni o l'accumulo di singole mutazioni o polimorfismi dell' mtDNA estratto da cellule del Purkinje con deficit istochimico di COX isolate mediante microdissettore laser. Per valutare la specificità dei risultati abbiamo eseguito lo stesso studio su cellule del Purkinje COX competenti dello stesso preparato e sulla ulteriore popolazione cellulare cerebellare.

4. MATERIALI E METODI

4.1 MODELLO ANIMALE

Gli esperimenti sono stati condotti su topi transgenici SCA1 B05/82Q allo stato eterozigote ed omozigote, gentilmente messi a disposizione dalla Dott.ssa Sara Bonato dell'Istituto IRCCS La Nostra Famiglia di Bosisio Parini – Lecco in collaborazione con il Prof. R.T. Horr, Institute of Human Genetics, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota (USA) e con il Prof. M. Pandolfo Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, (Belgio).

Questo modello murino di SCA1 esprime il cDNA del gene SCA1 umano contenente un'espansione del tratto poliQ (82Q) senza interruzione (Burrigh EN, 1995). L'espressione del transgene è stata posta sotto il controllo del promotore del gene *Pcp2/L 7*, specifico per le cellule del Purkinje (Vandaele S, 1991).

Gli animali sono stati stabulati in ambiente appropriatamente climatizzato, con alternanza di 12 ore di luce e 12 ore di buio, cibo ed acqua *ad libitum*.

La linea omozigote è stata mantenuta incrociando tra loro topi SCA 1 B05/82Q omozigoti. La linea eterozigote è stata mantenuta incrociando topi maschi SCA 1 B05/82Q con femmine wild-type FVB/N di 8-10 settimane, acquistate presso Charles River Laboratories. Circa il 50% dei nati, come atteso, risulta essere

positiva per il transgene SCA1 82Q, dato che conferma il normale sviluppo embrionale degli animali transgenici. Gli animali wild-type sono stati utilizzati come controlli dei littermates eterozigoti e degli omozigoti di pari età.

I topi transgenici sono stati genotipizzati tramite PCR (Burrigh EN, 1995).

Tutti gli esperimenti sono stati condotti osservando le linee-guida istituzionali in accordo con le leggi e la politica nazionale (D.I. no 116, G.U. suppl.40, Feb. 18, 1992, Circolare No.8 G.U. 14 luglio 1994) e internazionale (EEC Council directive 86/609, OJ L358,1 Dec. 12, 1987; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996).

Sono stati sacrificati 24 topi così ripartiti:

- sacrificio topi di 6 mesi:

- 4 omozigoti
- 5 eterozigoti
- 5 wild type

- sacrificio topi di 2 mesi:

- 4 omozigoti
- 4 eterozigoti
- 2 wild type

4.2 Prelievo, congelamento, stoccaggio

Sono stati eseguiti prelievi autoptici dell'intero encefalo immediatamente dopo il sacrificio dei diversi animali mediante dislocazione cervicale preceduta da anestesia con etere.

Il tessuto prelevato è stato raffreddato in isopentano, congelato e conservato in azoto liquido fino al momento dell'utilizzo.

4.3 Istologia ed istochimica

I campioni autoptici sono fissati su appositi supporti mediante resina OCT, tagliati al criostato a -25°C in sezioni di $8\ \mu\text{m}$ e raccolti su vetrini coprioggetto o vetrini polilisinati.

Le sezioni di cervelletto sono studiate con le seguenti metodiche istologiche ed istochimiche standardizzate (Dubowitz, 1985): Ematossilina-Eosina, Tricromica di Gomori, Blu di Metilene, COX, SDH, SDH con cianuro, doppia reazione COX/SDH.

4.4 *Analisi quantitativa delle cellule del Purkinje con difetto enzimatico di COX.*

Le valutazioni morfometriche delle cellule del Purkinje (PC) COX negative e COX competenti è fatta su sezioni cerebellari di 12 micron di spessore ottenute a distanze paragonabili dall'emergenza del quarto ventricolo. Ogni sezione viene acquisita interamente a 100 ingrandimenti con un microscopio Leica con video camera (Leica DCF 320) utilizzando un software per immagini dedicato (Leica Image Manager IM50). Le immagini sono state riassemblate utilizzando la versione 10.0 di Adobe Photoshop Cs3. In ogni ricostruzione vengono contate le PC COX negative e COX positive per ogni area funzionale (Archicerebellum, Neocerebellum, Paleocerebellum) utilizzando il programma Grabit-Matlab version 6.5.

I risultati ottenuti sono stati analizzati statisticamente con lo Student's t test.

4.5 *TUNEL*

Fissare il preparato in paraformaldeide al 4% per 30 min poi lavare in tampone fosfato (PBS) e permeabilizzate in una soluzione di Triton X-100 allo 0,1% in tampone sodio citrato pH 5,2 per 2 min a 4°C. Le sezioni sono quindi lavate in PBS e incubate per 30 min a 37°C con la miscela di reazione della TUNEL (Roche) preparata aggiungendo 5µl di una terminal desossinucleotidil transferasi a 45 µl di una miscela di nucleotidi legati alla fluoresceina.

Si allestisce il controllo negativo incubando con la miscela di nucleotidi senza l'enzima.

Le sezioni, dopo essere state lavate in PBS, sono incubate per 30 min a 37°C con un anticorpo anti-fluoresceina coniugato con fosfatasi alcalina (Converter –AP).

Successivamente la reazione è sviluppata con una soluzione substrato (NBT-BCIP) per 10 min al buio.

Dopo un lavaggio in H₂O le sezioni vengono montate con gel di glicerina. (Sciacco M, 2001).

4.6 *Immunoistochimica*

Sezioni criostatate degli emisferi encefalici e del cervelletto sono raccolte su vetrini polilisinati e fissate in paraformaldeide al 4% per 3 minuti. Successivo lavaggio in PBS quindi lavaggio in acqua ossigenata al 0,3% per 10 minuti. Lavaggio in PBS quindi preincubazione di 30 minuti in soluzione contenente 200 microlitri di normal goat serum, 0,1gr di bovine serum albumin, 30 microlitri di soluzione Triton. Incubare con anticorpo primario monoclonale anti neurofilamenti 200kd diluito 1:100 per un'ora e mezza quindi lavaggio in PBS. Si procede allo sviluppo in fluorescenza incubando con anticorpo anti mouse (488) diluito 1:200 per un'ora; lavaggio in PBS e montaggio del vetrino coprioggetto con gel di glicerina.

Sono state allestite tutte le sezioni in modo seriato al fine di poter confrontare gli aspetti morfologici con quelli istochimici ed immunoistochimici.

Dopo la tecnica, le sezioni di tessuto sono esaminate al microscopio ottico a fluorescenza.

4.7 Dosaggio enzimi della catena respiratoria mitocondriale

Frammenti di emisferi encefalici e cervelletto conservati in azoto liquido sono omogenati vetro contro vetro a 0 gradi in buffer tris a pH 7,2 con diluizione 1:10 e centrifugati per 10 minuti a 750 x g a 4°C. Il supernatante è utilizzato per valutare spettrofotometricamente l'attività dei seguenti enzimi: citocromo c ossidasi, citrato sintetasi (di matrice), succinato citocromo c ossido-reduttasi, NADH citocromo c ossido-reduttasi, succinato deidrogenasi, NADH-ubichinone ossido-reduttasi (rotenone-sensibile) (DiMauro S, 1987).

4.8 Localizzazione ultrastrutturale attività enzimatica COX

Studio condotto su 3 topi eterozigoti di 2 mesi e su 3 topi omozigoti di 6 mesi.

4.8.1 Esame standard:

Per l'indagine morfologica ultrastrutturale sono stati selezionati alcuni frammenti del cervelletto, fissati in glutaraldeide ed inclusi in resina.

In particolare ogni frammento è fissato in una soluzione di glutaraldeide al 5%, ove rimane per almeno 20 ore. Dopo tale intervallo di tempo si compie un lavaggio in tampone fosfato per 10 minuti e si procede quindi alla dissezione del pezzo biotico ottenendo dei campioni di 3-4 millimetri di lunghezza e di circa 2 mm di larghezza. Si passa poi alla post fissazione in tetrossido d'osmio al 4% per circa un'ora. Dopo un ulteriore lavaggio in tampone fosfato ha inizio la fase di disidratazione con la scala degli alcool.

Si passa poi all'inclusione in resina SPURR.

In particolare al termine della disidratazione i frammenti cerebellari sono trattati nel seguente modo:

passaggio in una miscela di alcool assoluto-resina in rapporto 1/1 per 30 minuti
passaggio in una miscela di alcool assoluto-resina in rapporto 1/2 per 30 minuti
passaggio in resina assoluta per 1 ora secondo passaggio in resina assoluta per tutta la notte.

Il giorno dopo, si posizionano i frammenti bioptici in apposite formelle, si riempiono queste ultime con la resina e si pone il tutto nella stufa per 12 ore.

Dai preparati così ottenuti si può procedere, tramite ultramicrotomo, al taglio di sezioni semifini (0,5 micron di spessore) ed ultrafini (600 Å). Le prime, dopo averle raccolte su vetrino, sono colorate con Blu di Toluidina, per le seconde è necessaria una metodica di colorazione più complessa.

Le sezioni ultrafini sono inizialmente raccolte su griglie (5-6 sezioni per griglia) e poi poste in incubazione al buio in una soluzione d'acetato d'uranile ed alcool etilico assoluto (in rapporto 1:1) per 25 minuti. Dopo gli opportuni lavaggi, si passa ad un'incubazione, della durata di 15 minuti, con citrato di piombo. Alla fine di questo passaggio le sezioni ultrafini sono pronte per essere osservate al microscopio elettronico.

4.8.2 Istochimica:

La reazione istochimica per la Citocromo c Ossidasi in microscopia elettronica è eseguita incubando per 1 ora a 37°C piccoli frammenti del tessuto in esame appena prelevati in una soluzione costituita da:

20 mg di DAB (diaminobenzidina), 10 ml di tampone fosfato (50 mM pH 7.4), 20 mg di catalase, 30 mg di citocromo C, 750 mg sucrosio.

Dopo lavaggi in tampone, i frammenti sono fissati in glutaraldeide al 2,5% per tutta la notte.

Si procede seguendo la metodica classica per l'inclusione in microscopia elettronica descritta in dettaglio nel precedente paragrafo. Le sezioni ultrafini non sono contrastate.

4.9 Estrazione DNA da tessuto cerebellare

L'estrazione da tessuto è stata eseguita con fenolo-cloroformio secondo la metodica standard (Maniatis, 1982).

4.10 Isolamento cellulare da tessuto mediante laser dissettore

Sezioni criostatate di emisferi encefalici e cervelletto murino di 12 micron sono raccolte su vetrino munito di film. Viene allestita la reazione COX contrastata con Blu di Metilene ed il vetrino viene lasciato asciugare all'aria. Il vetrino viene inserito con il film rivolto verso il basso nel portavetrino di un microdissettore laser (Leica AS LMD). Mediante obiettivo ad ingrandimento 630X vengono settate le condizioni

di intensità di taglio, apertura e velocità; in base al tessuto in esame: apertura 16, intensità 46, velocità 5, bridge medio, aperture diff. 6, offset 40.

Il raggio laser viene quindi diretto lungo i bordi di singole cellule di Purkinje. Vengono raccolte dapprima singole cellule di Purkinje COX deficitarie poi singole cellule di Purkinje COX competenti.

Le cellule di Purkinje (n = 400-500) vengono raccolte per gravità in un tappo di microvials posto sotto al vetrino in modo da raccogliere in tappi diversi le diverse cellule riconosciute tramite reazione COX e Blu di Metilene. Allo stesso modo si raccolgono le cellule dei granuli. Terminata ogni singola raccolta il tappo della microvials viene chiuso e spinnato ad una velocità maggiore di 2000 cicli/sec per pochi secondi (Burdach GJ, 2004).

4.11 Estrazione DNA da pool di cellule del Purkinje microdissectate

I campioni cellulari contenuti in microvials vengono lisati con soluzione Tris HCl 10mM a pH 8,1 alla quale viene aggiunta una dose di 0,4mg/ml di Proteinasi K alla temperatura di 65°C per 3 ore. (Tynismaa H, 2005) Il DNA genomico e mitocondriale è stato quindi isolato usando il kit QIAmp DNA Micro Kit (QUIAGEN) e risospeso in un volume finale di 30 microlitri di buffer salino.

4.12 Amplificazione del DNA mitocondriale

Sono stati impiegati primers specifici per mtDNA murino (4914-4935 e 15678-15659) e il seguente protocollo di amplificazione: 98°C per 30 secondi per un ciclo, 96°C per 15 secondi e touch down 70°-60°C per 15 secondi. 72° per 3 minuti e 10 secondi per 10 cicli, 96°C per 15 secondi e touch down 60°C per 15 secondi. 72° per 3 minuti e 10 secondi per 20 cicli e Taq polimerasi (Phusion FOMP1).

4.13 Analisi del contenuto in mtDNA su PC isolate con micro dissettore laser.

Vengono raccolte sezioni criostatiche di 12 micron e posizionate su appositi vetrini muniti di membrana sui quali viene allestita la reazione COX ed in seguito contrastati con Blu di Metilene e lasciati asciugare all'aria.

Su questi vetrini vengono individuate singole cellule COX competenti e COX deficitarie che vengono raccolte in vials indipendenti utilizzando un Leica Laser Microdissection System (Leica AS-LMD) (Edwards R.A. 2007, Xiang et al. 2004).

Cellule di Purkinje (PC) di topi omozigoti di 6 mesi sono state isolate da ogni sezione e raccolte in gruppi di 300 cellule per ogni tipo in singole provette. Abbiamo inoltre raccolto una pari quantità di cellule dei granuli da ogni topo come controllo interno relativo al contenuto di mtDNA.

Il DNA è stato estratto usando il kit QIAamp DNA Micro Kit (QUIAGEN).

Il contenuto in mtDNA è amplificato mediante Real Time PCR utilizzando il sistema ABI 7500 come descritto (Spinazzola et al 2006). A tal fine sono state utilizzate come sonde i primers dei geni COX I (mtDNA) e 18S ribosomiale (nDNA) murini. Tutte le determinazioni sono eseguite in quadruplicato utilizzando 5 microlitri di cellule lisate come template.

Il DNA nucleare normalizzato e i livelli di mtDNA sono espressi in termini di valore di quantificazione relativo (RQ) considerando come referenza (RQ=1) la quantità di mtDNA delle PC dei topi controllo.

Per lo studio delle mutazione puntiformi del mtDNA, il DNA estratto dalle PC di topi SCA1 di 6 mesi (n=4) e dei topi di controllo (n=3) viene amplificato utilizzando metodiche standard di PCR. Gli amplificati sono clonati e sequenziati in entrambe le direzioni, 5' e 3', utilizzando il kit BigDye 3.1 con un Genetic Analyzer 3100 (ABI).

Sono state studiate le seguenti regioni geniche di mtDNA murino: citocromo b (CytB, np 14073-14906), subunità 1 della citocromo c ossidasi (MT-COI, 5929-6316) e la regione regolatrice non codificante del D-loop che si estende dal nucleotide 2510 al 3020. Più di 10.000 nucleotidi di ogni regione sono stati analizzati per ogni campione.

5. RISULTATI

5.1 *Studio morfologico*

Cervelletto:

- **Istologia 2 mesi:**

Omozigoti: sono esaminate diverse sezioni che presentano una normale stratificazione dello strato granulare e molecolare. Le cellule del Purkinje appaiono rarefatte e non rispettano il normale allineamento essendo affondate anche negli strati adiacenti della corteccia per la presenza di alcuni elementi ectopici. Non si evidenziano cellule del Purkinje in necrosi.

Eterozigoti: sono esaminate diverse sezioni nelle quali le uniche alterazioni presenti sono rappresentate da una lieve perdita delle cellule del Purkinje con la presenza di poche cellule ectopiche nello strato molecolare e granulare. Fig 1

- **Istologia 6 mesi:**

Omozigoti: sono esaminate diverse sezioni che presentano una normale stratificazione dello strato granulare e molecolare. E' presente una diminuzione significativa delle cellule del Purkinje, numerose delle quali sono ectopiche soprattutto a livello dello strato molecolare ed occasionalmente anche nello strato granulare.

Eterozigoti: sono esaminate diverse sezioni che mostrano una perdita del numero di cellule del Purkinje nettamente inferiore rispetto a quella dei topi omozigoti. Occasionalmente cellule del Purkinje sono presenti sia nello strato molecolare che nello strato granulare. Fig 2

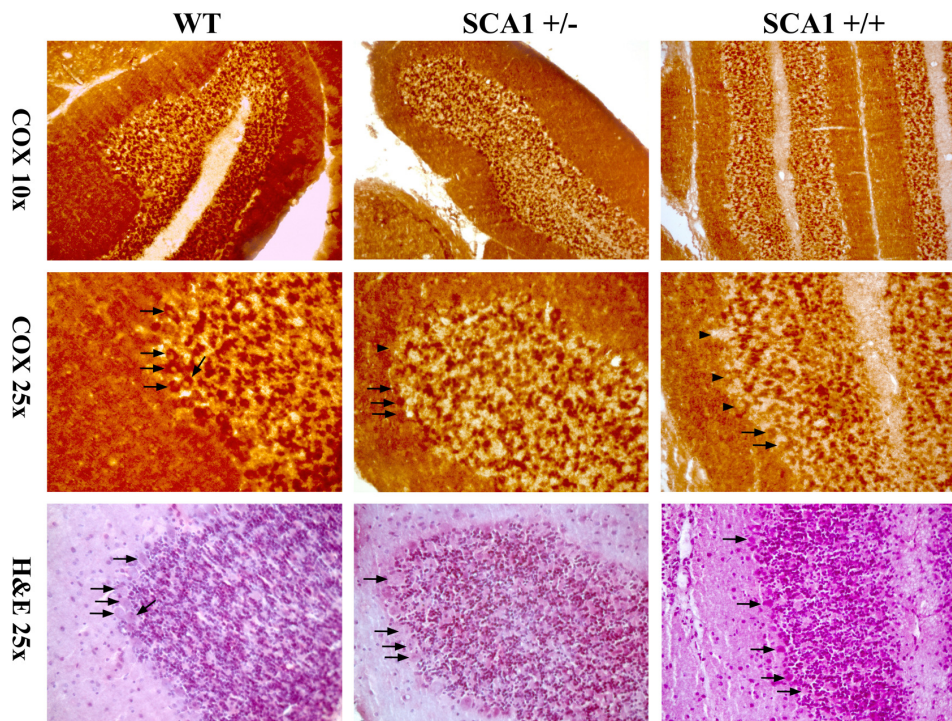


FIG.1

Microscopia ottica

Sezioni seriate di cervelletto di topo di 2 mesi. Le due righe di figure in alto mostrano la reazione COX in topi: wild type (WT), eterozigote (SCA1 +/-) ed omozigote (SCA1 +/+). La riga di figure in basso mostra la reazione per l'ematossilina ed eosina (H&E). Il deficit di attività COX in alcune cellule del Purkinje è indicato dalle teste di freccia. Le frecce indicano le PC con attività COX. Le frecce indicano entrambi i fenotipi nella riga di figure in basso.

- **Istochimica 2 mesi:**

Omozigoti: l'attività enzimatica citocromo *c* ossidasi (COX) è assente in rare cellule del Purkinje, mentre è normalmente presente a livello delle altre aree cerebellari.

Eterozigote: è evidente il deficit di attività COX come nei topi omozigoti. L'attività enzimatica COX è normalmente presente a livello delle altre aree cerebellari. Fig 1

- **Istochimica 6 mesi:**

Omozigoti: l'attività citocromo *c* ossidasi è assente in numerose cellule del Purkinje, mentre è normalmente presente a livello delle altre aree cerebellari.

Eterozigoti: l'attività citocromo *c* ossidasi è assente in numerose cellule del Purkinje, mentre è normalmente presente a livello delle altre aree cerebellari. Fig 2

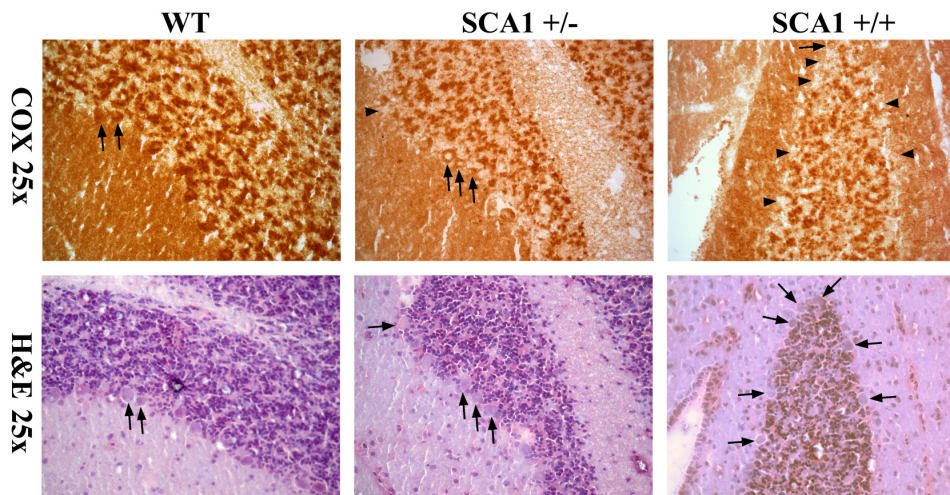


FIG.2

Microscopia ottica

Reazione COX ed H&E in topi di 6 mesi (WT, SCA1 +/-, SCA1 +/+). Il deficit di attività COX è evidente in un maggior numero di cellule. Riga in alto: PC con attività COX (freccie) e con deficit di attività COX (testa di freccia). Nella riga di figure in basso entrambi i tipi di PC sono indicate con freccie.

TUNEL:

Abbiamo rilevato la presenza di rare cellule del Purkinje TUNEL positive nei topi di 2 mesi. Nei topi di 6 mesi la reazione è positiva in un maggior numero di cellule. Fig 3

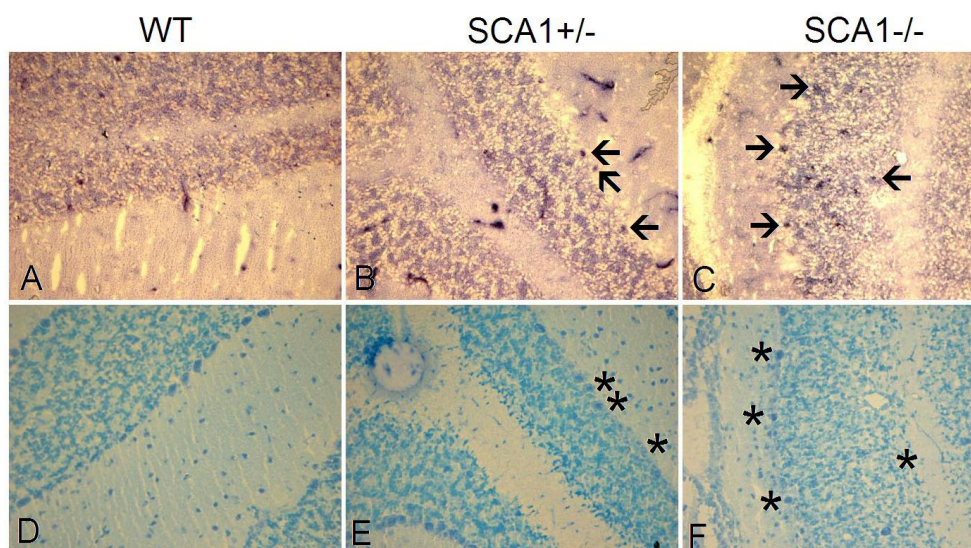


FIG.3

Microscopia ottica

Topi di 2 mesi. Reazione Tunel (riga di figure in alto), Blu di metilene (riga di figure in basso). La reazione Tunel è negativa nei topi WT e positiva in poche cellule del Purkinje nei topi SCA1. La Tunel positività è indicata dalle frecce.

Immunocitochimica:

Le ramificazioni dendritiche, visualizzate mediante Ab anti neurofilamenti 200Kd, sono di aspetto normale in tutti i topi esaminati.

A livello dell'encefalo,

non si evidenziano anomalie morfologiche o istochimiche, in tutte le aree esaminate. In particolare sono nella norma le reazioni per COX ed SDH. I risultati sopra descritti sono presenti in tutti gli animali esaminati e alle età di 2 e 6 mesi.

Non si osserva TUNEL positività.

5.2 Analisi quantitativa delle cellule del Purkinje con difetto enzimatico di COX.

Topi di 2 mesi:

Il 12% delle PC non presenta attività COX sia per quanto riguarda i topi eterozigoti che quelli omozigoti in tutte le aree studiate (Paleocerebellum, Archicerebellum, Neocerebellum) ($p < 0.001$).

Topi di 6 mesi:

Il 27-30% delle PC non presenta attività COX sia per quanto riguarda i topi eterozigoti che quelli omozigoti nelle aree del paleocerebellum e del neocerebellum ($p < 0,001$) nell'archicerebellum il deficit è nel 22% delle PC ($p < 0,02$).

Nei topi di controllo, la percentuale di PC prive di attività COX è minore del 3% in ogni area funzionale cerebellare.

5.3 *Analisi quantitativa apoptosi*

Analisi eseguita sui topi di 2 mesi, sia eterozigoti che omozigoti, in sezioni rappresentative del lobo anteriore del cervelletto.

La percentuale di PC in apoptosi a 3 minuti è risultata simile a quella dei topi wild type e in dettaglio del 13% nell'omozigote, del 10% nell'eterozigote e del 9% nel wild type.

5.4 *Studio biochimico*

Cervelletto:

Non si evidenziano differenze nei valori di citocromo c ossidasi nei topi di 2 mesi, sia omozigoti sia eterozigoti in confronto ai wild type. Nei topi di 6 mesi abbiamo evidenziato un aumento dell'attività citocromo c ossidasi nei topi omozigoti rispetto a quelli wild type.

Encefalo:

Nei topi di 2 mesi eterozigoti vi è un aumento d'attività citocromo c ossidasi rispetto ai controlli. In quelli di 6 mesi tale attività enzimatica è aumentata nei topi omozigoti.

5.5 Localizzazione ultrastrutturale attività enzimatica COX

- Esame standard:

Sono state esaminate numerose griglie dei topi a 2 e 6 mesi, sia omozigoti che eterozigoti. Le cellule degli strati molecolare e granulare hanno un aspetto normale. Alcune cellule del Purkinje presentano alterazioni degenerative rappresentate da rarefazione del reticolo rugoso, degli organuli citoplasmatici e da fenomeni di addensamento della cromatina nucleare. Non sono state identificate cellule con franchi aspetti apoptotici in quanto sia gli addensamenti nucleari sia le indentature della membrana nucleare, nonché la sua interruzione, non sono d'entità tale da poter essere identificate come cellule apoptotiche. Le alterazioni descritte sono qualitativamente identiche in tutti gli animali esaminati essendo peraltro quantitativamente più manifeste nei topi di 6 mesi rispetto a quelli di 2 mesi. Non vi sono alterazione della morfologia e del numero di mitocondri nelle griglie esaminate sia nelle PC dei topi wild-type che nelle PC dei topi transgenici. Fig 4

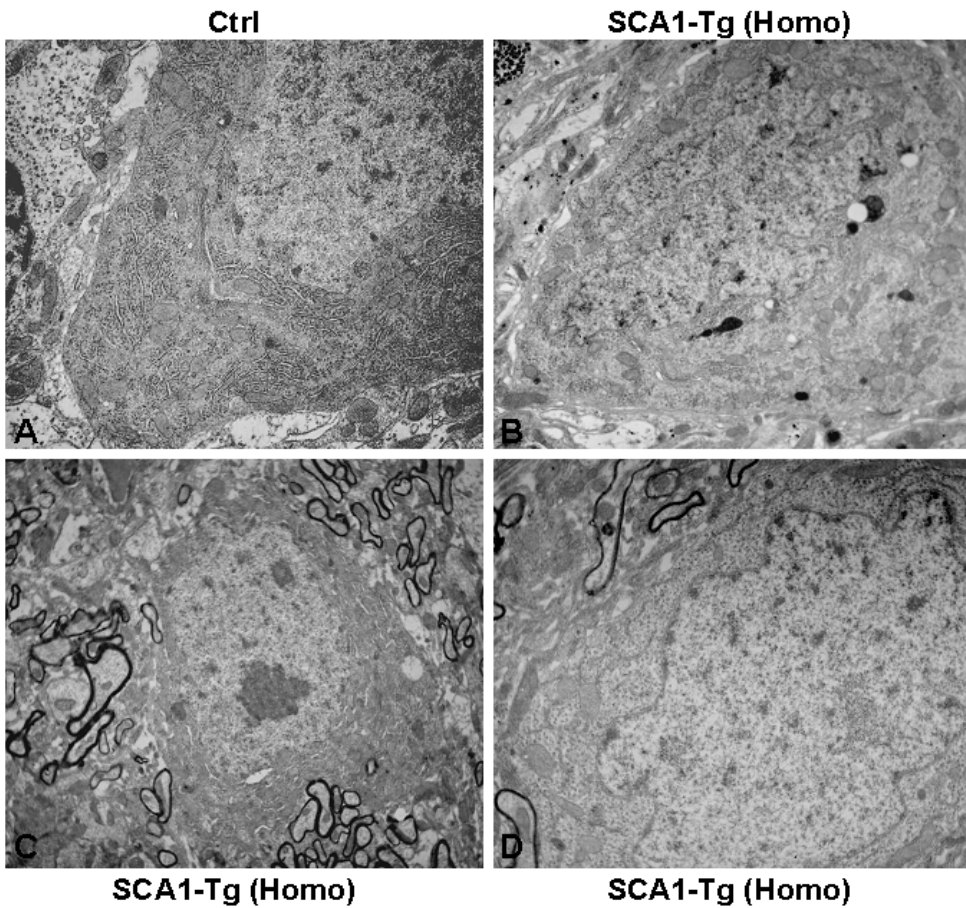


FIG. 4

Microscopia elettronica

*A: 7000X acetato di uranile e piombo. Mitochondri in cellula del Purkinje di topo WT
 B-C: 4400X, D: 7000 acetato di uranile e piombo. Mitochondri di numero e aspetto
 normale in cellule del Purkinje di topi SCA1 omozigoti.*

- Istochimica:

Reazioni controllo:

La reazione citocromo *c* ossidasi è evidente nelle cellule del Purkinje a livello mitocondriale, come forte elettrodensità delle membrane. Mitocondri COX positivi sono individuati nelle cellule dei granuli e dei canestri.

Cervelletto di topi SCA1:

Alcune cellule del Purkinje contengono mitocondri non elettrodensità, ovvero mitocondri privi di attività COX. Il numero di tali mitocondri è maggiore nei topi di 6 mesi rispetto a quelli di 2 mesi. Fig 5

Studio morfologico ed istochimico dell'encefalo:

Anche lo studio ultrastrutturale non ha evidenziato anomalie morfologiche o mitocondri privi di attività COX.

I risultati sopra descritti sono presenti in tutti gli animali esaminati e a tutte le età.

Topi controllo:

Tutti i topi esaminati mostrano una normale morfologia sia in microscopia ottica sia elettronica. L'attività citocromo *c* ossidasi è normalmente presente in particolare a livello delle cellule del Purkinje. Fig 5

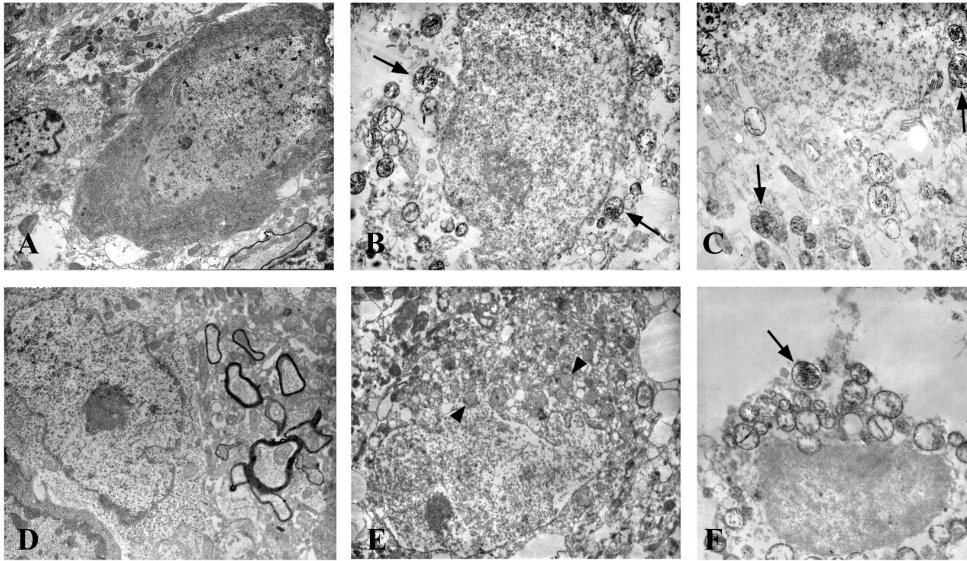


FIG. 5

Microscopia elettronica

Reazione COX in topi di 2 mesi wild type ed eterozigoti.

A: 4400X. Cellula del Purkinje di topo WT senza immunostaining per la COX.

B e C: 7000X. Attività enzimatica COX in PC di topo WT. Tutti i mitocondri mostrano attività COX (freccie).

D: 7000X. SCA1 +/- PC il cui nucleo mostra membrane interdigitate e interrotte con cromatina addensata.

*E: 4400X. Attività enzimatica COX nelle cellule di Purkinje di topi SCA1 +/-.
Alcuni mitocondri privi di attività COX (testa di freccia).*

*F: 7000X Attività enzimatica COX nelle cellule dei granuli di topi SCA1 +/-.
Tutti i mitocondri mostrano attività COX (freccie).*

5.6 Amplificazione mtDNA da tessuto cerebellare

L'amplificazione del mtDNA da tessuto cerebellare ha evidenziato solo la banda wild-type di 10764 bp .

5.7 Isolamento al microdissettore delle cellule del Purkinje

Le difficoltà incontrate nella dissezione di singole cellule cerebellari sono in gran parte legate alle esigue dimensioni delle medesime rispetto ad altri tipi cellulari. Le cellule del Purkinje hanno dimensioni più voluminose delle cellule dei granuli e dei canestri e sono fisiologicamente localizzate a palizzata tra lo strato granulare e molecolare cerebellare, anche per tale motivo lo studio di singole cellule isolate da tessuto ha avuto inizio da esse. Sebbene più voluminose, le cellule del Purkinje perdono il dettaglio morfologico se allestite unicamente con reazione COX, pertanto risulta difficoltoso riconoscere e isolare quelle COX deficitarie dalla restante popolazione neuronale COX competente. Si è reso quindi necessario contrastare i preparati con altre reazioni. A tal fine sono state messe a punto le reazioni SDH, SDH con cianuro, Ematossilina-Eosina, Blu di Metilene. Tra queste è stata scelta la controcolorazione con Blu di Metilene per la miglior intellegibilità del risultato, la praticità e rapidità di allestimento.

Sezioni di emisferi encefalici e cervelletto di topi affetti sacrificati a 6 mesi sono state tagliate ad uno spessore di 8 micron e preparati con reazione COX-Blu di Metilene. Le sezioni sono state raccolte su appositi vetrini muniti di film per essere sottoposte alla raccolta tramite microdissettore laser. La raccolta cellulare è stata possibile dopo settaggio del raggio laser secondo lo spessore e la natura del tessuto in esame. Fig.6

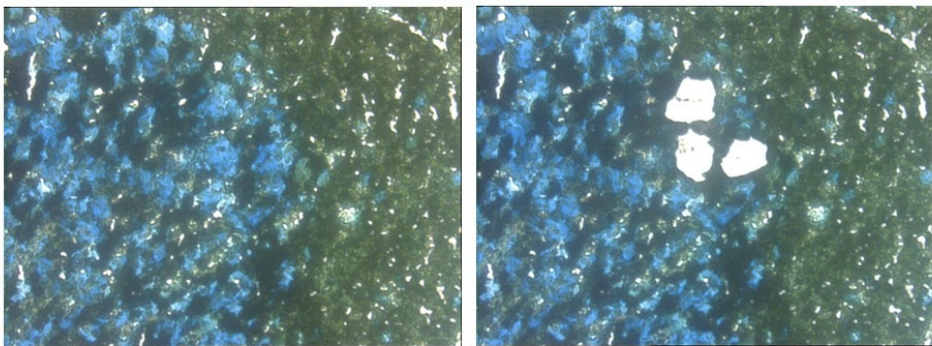


FIG. 6

Microdissezione laser di 3 cellule del Purkinje COX deficitarie in topo omozigote SCA1 sacrificato a 6 mesi. Evidenza della avvenuta raccolta cellulare (aree bianche nella foto di dx) (630X).

Raccolte di 25, 50 e 100 cellule sono risultate insufficienti ad ottenere un'amplificazione dell' mtDNA. E' stato possibile isolare mtDNA da pool di 400-500 cellule del Purkinje estratte da sezioni dello spessore di 12 micron.

5.8 *Analisi mutazionale mtDNA*

L' amplificazione e la corsa elettroforetica di regioni in grado di identificare molecole full lenght del mtDNA e di regioni parziali del genoma mitocondriale non ha evidenziato macroriarrangiamenti, analogamente allo stesso studio condotto su tessuto cerebellare. Sono state studiate le seguenti regioni geniche di mtDNA murino: citocromo b (CytB, np 14073-14906), subunità 1 della citocromo c ossidasi (MT-COI, 5929-6316) e la regione regolatrice non codificante del D-loop che si estende dal nucleotide 2510 al 3020. Più di 10.000 nucleotidi di ogni regione sono stati analizzati per ogni campione. Fig.7

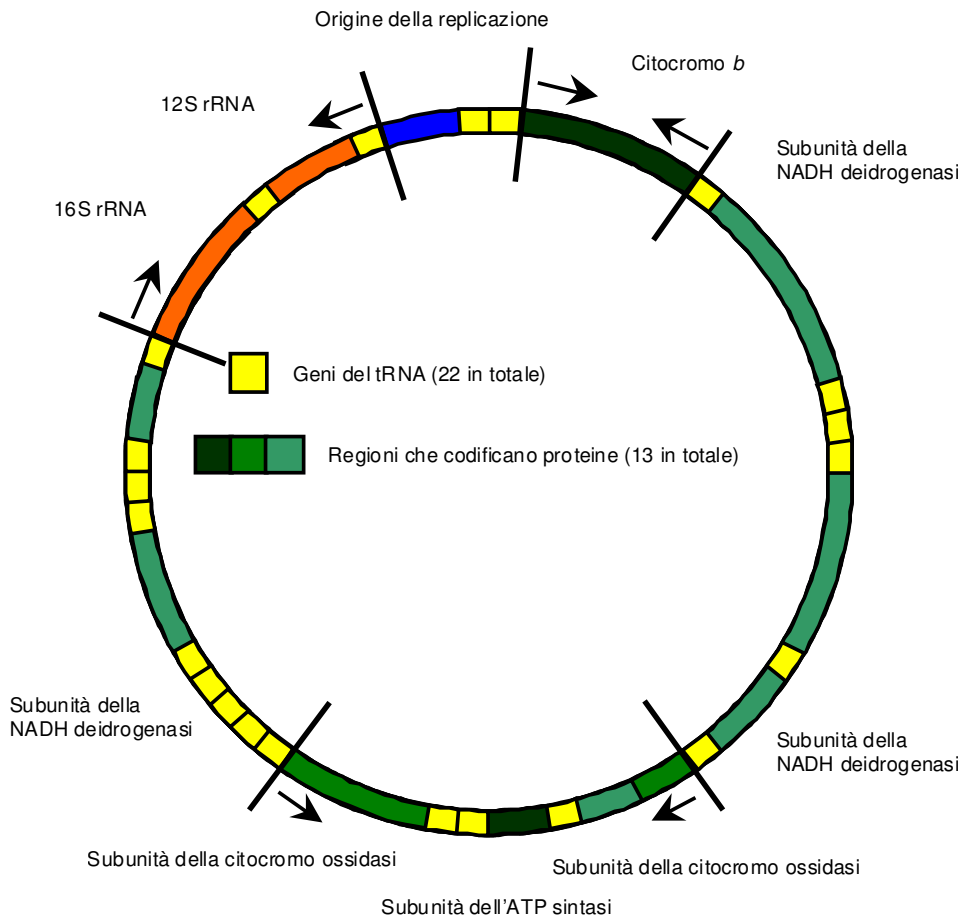


FIG. 7

Schema del DNA mitocondriale con la sede dei primers utilizzati per l'allestimento dei cloni delle regioni: COX, Cit b, non coding.

5.9 Analisi molecolare del mtDNA

5.9.1 Ricerca deplezione mt-DNA

Abbiamo quantificato, con modalità di quantificazione relativa (RQ), il mtDNA nelle PC raccolte al microdissettore laser mediante PCR in una serie di esperimenti. Il contenuto in mtDNA nelle PC COX negative è significativamente ridotto sia confrontato con il mtDNA delle PC COX positive isolate dai medesimi topi SCA1 che confrontato con i topi controllo ($n=4$, $p < 0,005$). Non abbiamo notato differenze nel contenuto in mtDNA fra le PC COX positive dei topi SCA1 e quelli controllo ($n=4$, $p = 0.52$). Fig 8A

Il contenuto in mtDNA non era omogeneo in tutti i topi studiati. Tuttavia il rapporto fra i livelli di mtDNA delle PC COX positive e COX negative studiate ha dimostrato una importante deplezione di mtDNA che variava dal 63 all'89% in tutti i topi mutati. Fig 8B

Importante notare che questi dati sono specifici delle PC. Infatti, le cellule dei granuli (GC) isolate dai topi SCA1 e da quelli controllo non ha dimostrato alcuna differenza nel contenuto in mtDNA ($n=6$, $p = 0,41$). .Fig 8C

Infine, la quantificazione del mtDNA è stata eseguita su tessuto encefalico e cerebellare in toto. Il contenuto di mtDNA a livello encefalico non ha mostrato

differenze fra i topi mutati e quelli di controllo ($n=3$, $p=0,24$). Al contrario, abbiamo osservato una riduzione significativa nel contenuto in mtDNA ($n=3$, $p < 0,05$) a livello cerebellare nei topi SCA1, anche se il livello di deplezione era minore di quanto osservato nelle PC isolate. Fig 8D. Tali risultati sono stati confermati mediante un saggio alternativo per la quantificazione di mtDNA (sonda disegnata all'interno della regione ND1).

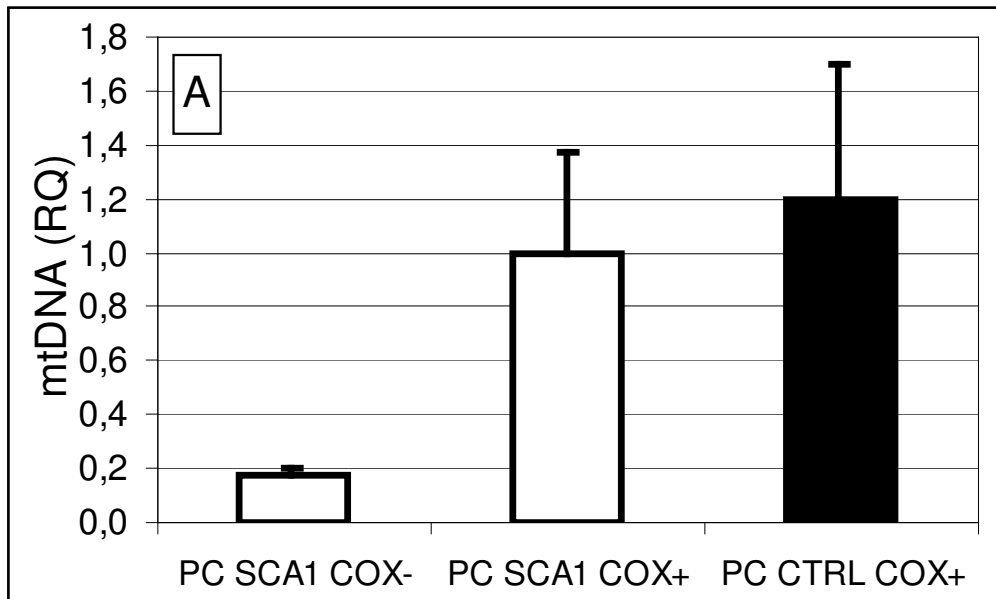


Fig. 8A

Quantificazione del mtDNA mediante PCR quantitativa su cellule PC isolate. Il contenuto in mtDNA nelle PC COX negative è significativamente ridotto sia confrontato con il mtDNA delle PC COX positive isolate dai medesimi topi malati che confrontato con i topi controllo ($n=4$, $p < 0,005$). Non si osservano differenze nel contenuto in mtDNA fra le PC COX positive dei topi SCA1 e quelli controllo ($n=4$, $p=0,52$).

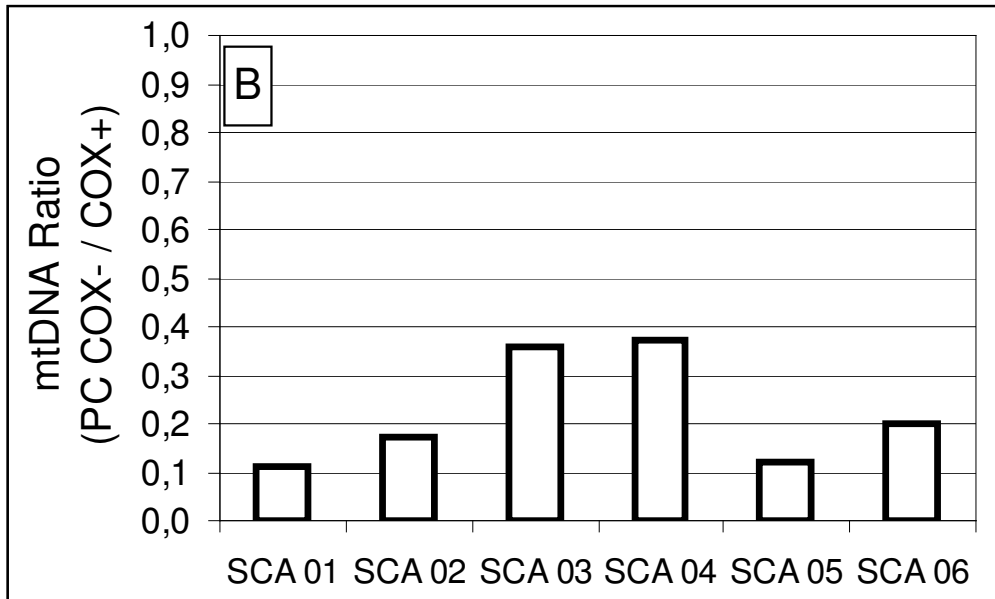


Fig 8B

Quantificazione della variazione del contenuto di mtDNA mediante PCR quantitativa su cellule PC isolate. Il rapporto fra i livelli di mtDNA delle PC COX positive e COX negative studiate ha dimostrato una importante deplezione di mtDNA che variava dal 63 all'89% in tutti i topi mutati.

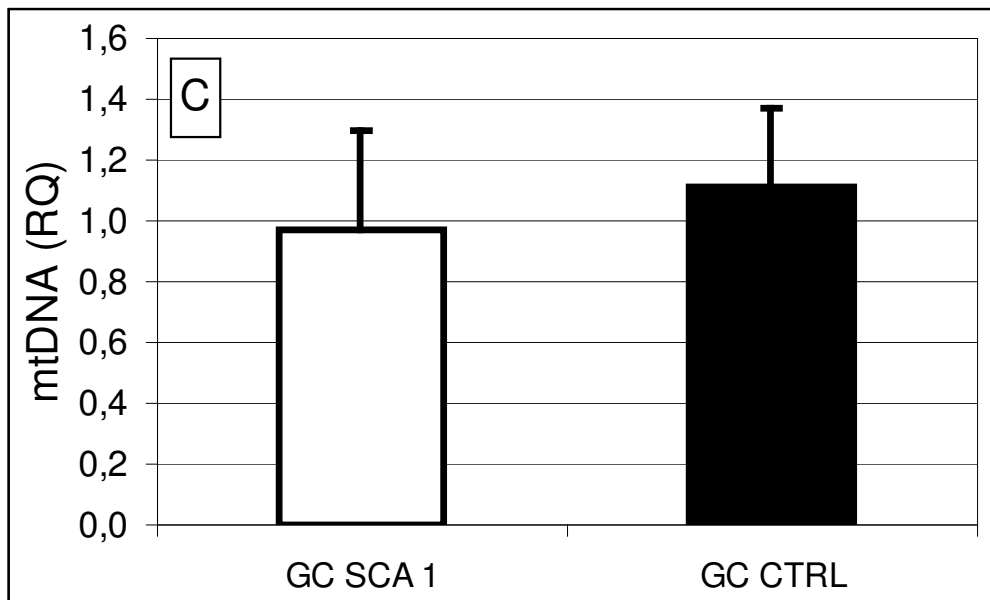


Fig 8C

Quantificazione del mtDNA mediante PCR quantitativa su cellule GC isolate. Le cellule dei granuli (GC) isolate dai topi SCA1 e da quelli controllo non mostrano differenze nel contenuto in mtDNA

(n=6, p = 0,41).

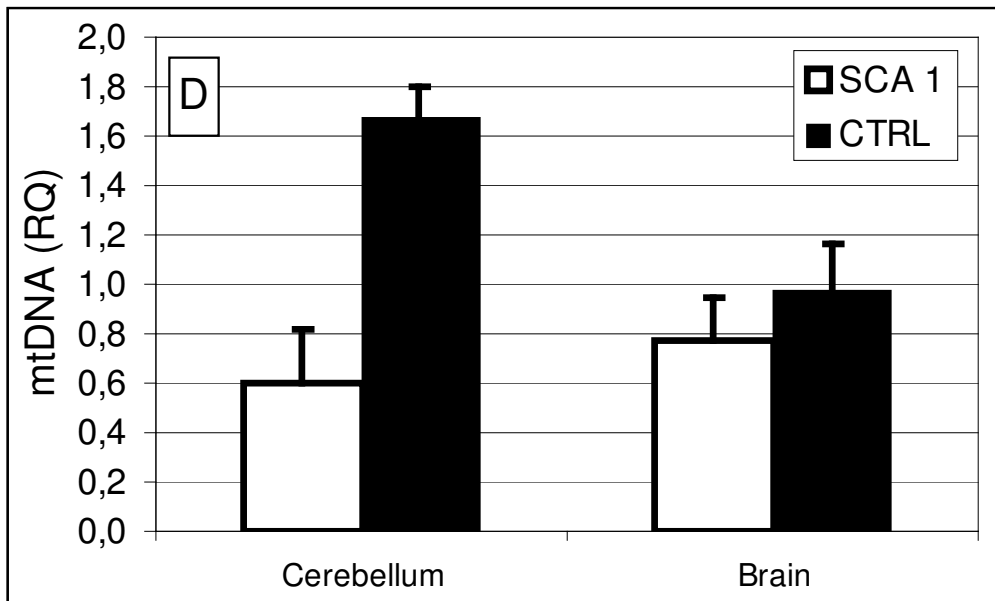


Fig 8D

Quantificazione del mtDNA mediante PCR quantitativa su tessuto cerebrale e cerebellare. Il contenuto di mtDNA a livello encefalico non ha mostrato differenze fra i topi mutati e quelli di controllo ($n=3$, $p=0,24$). Al contrario, si osserva una riduzione significativa nel contenuto in mtDNA ($n=3$, $p < 0,05$) a livello cerebellare nei topi SCA1, anche se il livello di deplezione era minore di quanto osservato nelle PC isolate.

5.9.2 Ricerca mutazioni puntiformi mtDNA

Abbiamo indagato la presenza di mutazioni a livello del mtDNA attraverso la sequenza di multipli cloni di frammenti di mtDNA. Tali cloni sono stati ottenuti mediante amplificazione PCR di DNA totale estratto sia da PC COX negative che PC COX positive di topi SCA1 di 6 mesi. Come controllo sono state utilizzate PC COX competenti di topi sani. Sono state considerate 3 regioni del genoma mitocondriale: CytB, MT-COI e la regione non codificante del D-loop. L'analisi di sequenza ha evidenziato meno di una mutazione puntiforme in 10kbp nella regione del CytB del mtDNA amplificato sia da PC COX positive che PC COX negative. Nessuna mutazione è stata rilevata nei cloni rappresentativi della regione MT-COI e del D-loop.

In conclusione, non abbiamo trovato mutazioni a carico del mtDNA nei topi SCA1.

6. DISCUSSIONE

In fase presintomatica il modello animale murino transgenico della SCA1 presenta un evidente, anche se parcellare, deficit ossidativo di Complesso IV della catena respiratoria mitocondriale a carico delle cellule del Purkinje.

Il deficit, rilevato istochimicamente, del complesso citocromo *c* ossidasi è selettivo delle cellule del Purkinje. Infatti la reazione istochimica è normalmente presente nelle cellule dei granuli. Il deficit è stato rilevato sia in topi eterozigoti che omozigoti ed il difetto diventa maggiormente evidente in quelli di 6 mesi rispetto a quelli di 2, indicandone la natura progressiva. Inoltre, il dosaggio biochimico degli enzimi della catena mitocondriale eseguito su omogenato dell'intero tessuto cerebellare (così come di altre porzioni dell'encefalo del topo SCA1) non ha dimostrato deficit di attività enzimatica tra topi sani e malati.

Il difetto ossidativo mitocondriale a carico delle cellule del Purkinje è un evento molto precoce nell'ambito delle alterazioni funzionali nel modello animale di SCA1. Tale difetto è infatti presente in topi di 2 mesi, età alla quale non è ancora manifesto il fenotipo clinico. La precocità dell'evento è anche dimostrata dalla normale localizzazione degli anticorpi antifilamento che hanno permesso di identificare un'arborizzazione dendritica identica a quella dei topi wild type. La reazione TUNEL sui preparati di 2 e 6 mesi non ha mostrato una significativa quota di cellule del Purkinje in apoptosi se confrontata con il rilevato deficit ossidativo mitocondriale.

Tale dato permette di escludere l'apoptosi come evento patogenetico precoce della malattia.

Data la specificità cellulare del deficit di COX, abbiamo indagato a livello subcellulare, con metodiche ultrastrutturali di microscopia elettronica l'attività del complesso IV a livello dei mitocondri delle cellule del Purkinje. Questo studio è stato possibile grazie all'allestimento di preparati in microscopia elettronica che hanno consentito di evidenziare la reazione enzimatica citocromo *c* ossidasica a livello delle creste mitocondriali.

I risultati ottenuti hanno permesso di confermare come il difetto ossidativo mitocondriale sia effettivamente confinato ai mitocondri delle cellule del Purkinje. Questo dato è in accordo e conferma quanto avevamo ottenuto con le metodiche in microscopia ottica, concorrendo a confermare che una sostanziale proporzione di cellule del Purkinje nei topi di 2 mesi presentavano mitocondri completamente privi di attività COX. Questo difetto era più manifesto nei topi di 6 mesi.

La specificità del difetto ossidativo era confermata dalla presenza di una normale attività enzimatica COX a livello dei mitocondri delle limitrofe cellule dei granuli.

Infine è importante sottolineare come l'esame standard in microscopia elettronica ha evidenziato che il difetto ossidativo mitocondriale è presente in cellule prive di alterazioni degenerative. Solo nei topi di 6 mesi alcune cellule del Purkinje presentavano infatti una rarefazione del reticolo rugoso e degli organuli citoplasmatici.

In conclusione i dati ottenuti in microscopia elettronica hanno contribuito a legittimare la prosecuzione dello studio mediante isolamento delle singole cellule del Purkinje con estrazione e studio del mtDNA.

A tal fine siamo riusciti a superare le difficoltà della messa a punto metodologica inerente l'identificazione, l'isolamento e la successiva raccolta delle cellule del Purkinje dalle quali estrarre il mtDNA. Siamo infatti riusciti ad isolare mtDNA da pool di 400-500 cellule del Purkinje estratte da sezioni dello spessore di 12 micron.

In letteratura esistono numerosi lavori ove questa metodica è stata utilizzata in patologie neuromuscolari (Pinòs T 2010). Sono stati eseguiti studi di microdissezione su singoli pool di cellule cerebellari in pazienti affetti da atrofia dentato-rubro-pallido-luysiana, che non erano però correlati ad un'analisi del metabolismo mitocondriale (Watanabe H 2000). Abbiamo quindi indagato, tramite saggio di Real Time PCR, la presenza di alterazioni quantitative dell'mtDNA e tramite sequenza la presenza di eventuali mutazioni puntiformi.

Nella SCA1, autosomica dominante, la degenerazione neuronale colpisce primariamente le cellule del Purkinje ed i neuroni del tronco encefalico condizionando il caratteristico fenotipo atassico e bulbare. Nel topo transgenico modello animale della SCA1 vi è una overespressione della proteina umana Ataxina1 mutata nelle cellule del Purkinje che è sufficiente a produrre degenerazione ed atassia (Burrigh et al 1995); la patologia si sviluppa e progredisce come risultante delle disfunzioni neuronali piuttosto che della perdita cellulare (Clark et al 1997) rendendo questo modello animale utile per studiare le cause della alterazione funzionale delle PC e per studiare quindi la patogenesi della malattia.

I nostri risultati mostrano un selettivo difetto di COX nei topi transgenici in numerose PC mentre tale attività è normale sia nelle altre cellule cerebellari che nei topi di controllo. In particolare, abbiamo individuato cellule PC COX deficitarie

sia in topi eterozigoti che omozigoti con un difetto più evidente nei topi più anziani. In questi la percentuale di PC COX deficitarie arrivava al 30%.

Importante notare che, per tutte le età studiate, il difetto ossidativo era allo stesso livello sia nei topi eterozigoti che omozigoti indicando quindi che l'accumulo della proteina mutata atassina1 negli eterozigoti è sufficiente a determinare il danno neuronale. Abbiamo inoltre investigato l'eventuale presenza di fenomeni apoptotici in quanto è stato ipotizzato che l'accumulo di poliglutamina può attivare questo meccanismo portando ad una perdita cellulare (Paulson et al 2000). Peraltro, altri autori hanno studiato in questo modello animale l'eventuale presenza di fenomeni apoptotici senza averne una chiara evidenza (Shahbazian et al 2001). Le nostre evidenze di rari nuclei in apoptosi soprattutto in topi di 6 mesi è in accordo con i citati precedenti studi.

Lo studio biochimico dell'attività COX su omogenato cerebellare non evidenzia deficit enzimatico. Questo risultato può essere interpretato considerando la differente metodologia impiegata per valutare l'attività del complesso IV. Lo studio istochimico permette infatti di rilevare il difetto enzimatico in specifici tipi cellulari (in questo caso isolato alle PC) mentre la metodica biochimica esamina un omogenato cerebellare contenente anche numerose altre cellule che, non presentando il deficit, possono mascherare il difetto.

Considerato che il modello transgenico da noi analizzato esprime il transgene umano espanso di SCA1 solo nelle cellule del Purkinje, i dati osservati ci suggeriscono che a) solo cellule esprimenti la proteina SCA1 umana mutata possono manifestare, in diverse fasi della malattia, un importante deficit di almeno un complesso della catena respiratoria ; b) il difetto ossidativo mitocondriale è direttamente connesso a questa variabile, conferendo specificità patogenetica a

quanto osservato; c) non può essere accertato o escluso che nell'uomo o in altri modelli sistemici di espressione di SCA1 mutata fenomeni analoghi coinvolgano altre cellule o tessuti.

Nell'ottica di cercare la causa del selettivo difetto ossidativo abbiamo deciso di studiare le caratteristiche di sequenza, integrità strutturale e quantità delle molecole di DNA mitocondriale sia in PC di topi controllo, che nelle PC COX negative che in quelle COX positive di topi transgenici. In particolare abbiamo testato topi omozigoti di 6 mesi con i relativi controlli, identificando e quindi isolando con un microdissettore laser le PC COX competenti e quelle COX deficitarie.

L'analisi tramite long-range PCR non ha rilevato la presenza di molecole delete di mtDNA, un fenomeno associato a differenti condizioni fisiologiche e patologiche. In particolare delezioni del mtDNA a basso livello accompagnano fenomeni fisiologici di invecchiamento in tessuti costituiti da cellule perenni o con turn-over relativamente lento; mentre una quota molto rilevante di molecole delete (singole o multiple) si riscontrano in alcune encefalomiopatie mitocondriali. L'assenza di riarrangiamenti deletivi suggerisce che il difetto ossidativo del Complesso IV da noi osservato non è un effetto collaterale di una senescenza accelerata dalla presenza del transgene, ma una manifestazione specifica di una catena patologica precoce di sofferenza cellulare. In direzione analoga deve essere interpretato il dato negativo rispetto alla variabilità nucleotidica del mtDNA anche in cellule COX-negative, indicando che il transgene SCA1 non si comporta come un gene "mutator", cioè induttivo dell'accumularsi di mutazioni somatiche del mtDNA. Al contrario è di estremo interesse il fatto che la determinazione del livello quantitativo del mtDNA attraverso una Real time PCR sia nelle PC che nelle cellule dei granuli

identifichi una selettiva deplezione di mtDNA nelle PC COX deficitarie. Questo dato avvalorza l'ipotesi che l'espressione del transgene contribuisca direttamente alla disfunzione mitocondriale delle PC e che il difetto nella catena respiratoria mitocondriale sia strettamente correlato ad un difetto nella omeostasi dell'mtDNA. Tra l'altro il dato suggerisce che probabilmente il difetto enzimatico coinvolga tutti i complessi della catena respiratoria mitocondriale codificati per una o più subunità dal mtDNA (Complessi I, III, IV e V): tuttavia questa ipotesi che andrebbe testata in situ sulle PC non è al momento verificabile, in quanto non vi sono metodi riproducibili per testare attività non-COX a livello istochimico ed ultrastrutturale. Tuttavia la correlazione fra deplezione del mtDNA e difetto di COX è sufficientemente robusta da stabilire un rapporto diretto di causa/effetto tra queste due osservazioni. Meno chiaro è la natura parcellare di questo difetto: il 12% delle PC a 2 mesi ed il 22-30% a 6 mesi presentano un deficit evidente. Non abbiamo una spiegazione al proposito ma ricordiamo che in numerose malattie mitocondriali con difetto genetico noto e deplezione di mtDNA è comune osservare nelle biopsie muscolari di tali pazienti sia fibre COX positive che fibre COX negative (Di Mauro et al., 2006) analogamente, quindi, a quanto abbiamo osservato nelle PC dei topi transgenici. L'omeostasi del mtDNA necessita di un pool di proteine codificate dal DNA nucleare le cui alterazioni sono state associate ad alcune patologie umane. Ad esempio mutazioni autosomiche recessive in geni che codificano per la polimerasi gamma mitocondriale e la elicasi mitocondriale (Twinkle) sono la causa di 2 sindromi atassiche quali la MIRAS (Winterthun et al 2005) e l'atassia spinocerebellare ad esordio infantile (IOSCA) (Nikali et al 2005). Questi pazienti sono portatori di deplezioni parziali del mtDNA e non presentano una miopatia

mitocondriale suggerendo come il difetto delle proteine coinvolte nell'apparato replicativo mitocondriale può produrre un'alterazione limitata al SNC.

Di recente è stato dimostrato che l'aprataxina, codificata dal gene APTX, è localizzata a livello mitocondriale e ha la funzione di preservarne la funzione. Mutazioni autosomiche recessive in tale gene portano ad un quadro atassico con aprassia oculo-motoria (AOA1), una rara malattia caratterizzata da atrofia cerebellare e perdita di cellule del Purkinje. In questi casi è stata dimostrata sperimentalmente una deplezione di mtDNA (Sykora et al. 2011).

Il selettivo danno a carico di specifiche cellule del SNC è una caratteristica peculiare delle malattie degenerative e, specificamente per disfunzioni cerebellari, bisogna considerare che le PC hanno una arborizzazione dendritica molto più estesa di quella di ogni altro neurone cosa che le rende probabilmente più sensibili ad una alterazione metabolica mitocondriale (Matoba et al 2000).

Sebbene le atassie ereditarie siano un gruppo molto eterogeneo di affezioni, causate da alterazioni in diversi geni e quindi caratterizzate da meccanismi patogenetici differenti, lo stress ossidativo, come spiegato nell'introduzione e come dimostrato dai nostri risultati, sembra avere un ruolo rilevante nella patogenesi della SCA1. Inoltre, disfunzioni mitocondriali contribuiscono alla patogenesi di altre malattie degenerative come Alzheimer, Huntington, Parkinson e SLA (Ciammola et al. 2011, Crugnola et al. 2010, Costa et al. 2010).

Nel modello animale da noi studiato il difetto ossidativo mitocondriale è dovuto ad una riduzione di copie di mtDNA, come dimostrato con una quantitativa PCR. Interessante notare, a supporto di questo dato, come l'esame ultrastrutturale abbia dimostrato un numero ed una morfologia normale di mitocondri nei topi SCA1, confrontati con topi wild type.

Vi sono inoltre in letteratura segnalazioni di altre malattie neurodegenerative da espansione di triplette con associata disfunzione mitocondriale (Cui et al., 2006; Marmolino et al., 2010) e tali dati sono confortati dai nostri risultati che dimostrano una specificità nella relazione fra deplezione del mtDNA e difetto ossidativo nelle PC dei topi SCA1. Infatti, lo studio in microscopia elettronica, che ha dimostrato un normale numero ed un normale aspetto dei mitocondri nelle PC dei topi SCA1, confermando come la deplezione del mtDNA non sia dipendente da una modifica dell'apparato mitocondriale, ci permette di ipotizzare l'esistenza di uno o più fattori coinvolti nella omeostasi del mtDNA che vengono alterati dalla atassina mutata a livello delle PC. Studi di "gene expression profiles", condotti nel cervelletto di topi SCA1, non hanno evidenziato geni candidati che potessero spiegare la riduzione di mtDNA osservata nelle PC (Serra et al 2004; Crespo-Barreto et al 2010). Bisogna peraltro considerare che questi studi sono stati condotti su cervelletto in toto e non su un pool di PC isolate. Appare quindi evidente come sarebbero importanti studi atti ad indagare modifiche di trascrizione e di proteomica in cellule del Purkinje isolate con la finalità di spiegare le selettive disfunzioni mitocondriali da noi osservate. Il fatto che tali disfunzioni siano già presenti nei topi di due mesi permettono di ipotizzare che il difetto ossidativo rappresenti uno dei più precoci eventi patogenetici che portano alla disfunzione delle PC.

7. BIBLIOGRAFIA

- Blakely EL, Mitchell AL, Fisher N, Meunier B, Nijtmans LG, Schaefer AM, Jackson MJ, Turnbull DM, Taylor RW. A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *FEBS journal* 272 2005 3583-3592.
- Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J 2008 *Neurology in clinical Practice*, vol2, pp 2132-2135.
- Burdach GJ, Dehn Doris, Nagel B, Del Turco D, Deller T. Laser microdissection of immunolabeled allows of astrocytic gene expression. *J Neu Meth* 138 (2004) 141-148.
- Burreight EN, Clark HB, Servadio A, Matilla T, Feddersen RM, Yunis WS, Duvick LA, Zoghbi HY, Orr HT. SCA 1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell* 82 (6): 937-48, 1995.
- Burreight EN, Clark HB, Servadio A, Matilla T, Feddersen RM, Yunis WS, Duvick LA, Zoghbi HY, Orr HT. SCA 1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell* 82 (6): 937-48, 1995.
- Ciammola, A., Sassone, J., Sciacco, M., Mencacci, N.E., Ripolone, M., Bizzi, C., Colciago, C., Moggio, M., Parati, G., Silani, V., Malfatto, G., 2011.

Low anaerobic threshold and increased skeletal muscle lactate production in subjects with Huntington's disease. *Mov Disord.* 26(1), 130-137.

- Clark H.B., Burrigh E.N., Yunis W.S., Larson S., Wilcox C., Hartman B., Matilla A., Zoghbi H.Y. and Orr H.T. Purkinje cell expression of mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviours, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations. *J of Neuroscience*, October 1, 1997, 17 (19): 7385-7395
- Costa, V., Giacomello, M., Hudec, R., Lopreiato, R., Ermak, G., Lim, D., Malorni, W., Davies, K.J., Carafoli, E., Scorrano, L., 2010. Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO Mol. Med.* 2(12), 490-503.
- DiMauro S. Mitochondrial myopathies. *Curr Opin Rheumatol.* 2006. 18: 636-641.
- DiMauro S, Wallace DC. Mitochondrial DNA in human pathology. 1993 Raven Press New York p.169
- DiMauro S, Servidei S, Zeviani M, et al. Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann Neurol.* 1987; 22:498-506.
- Dubowitz V. Muscle biopsy, a practical approach. (1985) 2nd ed Bailliere Tindal, London
- Duenas M.A., Goold R., Giunti P. (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129, 1357-1370.
- Gironi M, Lamperti C, Nemni R, Moggio M, Comi G, Guerini FR, Ferrante P, Canal N, Naini A, Bresolin N, Di Mauro S. Late onset cerebellar ataxia with

hypogonadism and muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 2004;62:818-820.

- Globas C, duMontcel ST, Baliko L, Boesh S, Depondt C, DiDonato S, Durr A, Filla A, Klockgether T, Mariotti C, Melegh B, Rakowicz M, Ribai P, Rola R, Schmitz-Hubsch T, Szymanski S, Timmann D, Van de Warrenburg B, Bauer P, Schols L. Early symptoms in spinocerebellar ataxia type 1,2,3 and 6. *Movement Disorders* 2008 DOI 10.1002/mds.22288
- Guerrini L, Lolli F, Ginestroni A, Belli G, Della Nave R, Tessa C, Foresti S, Cosottini M, Piacentini S, Salvi F, Plasmati R, DeGrandis D, Siciliano G, Filla A and Ma scalchi M. Brainstem neurodegeneration correlates with clinical dysfunction in SCA1 but not in SCA2. A quantitative volumetric, diffusion and proton spectroscopy MR study. *Brain* 2004, 127, 1785-1795.
- Harding AE: The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'. *Brain* 1982, 105(Pt1):1-28.
- Hirano M, Angelini C, Montagna P, Hays AP, Tanji K, Mitsumoto H, Gordon PH, Naini AB, DiMauro S, Rowland LP. Amyotrophic lateral sclerosis with ragged red fibers. *Arch Neurol.* 2008 Mar; 65 (3): 403-6.
- Hughes, RE 2002. Polyglutamine disease: Acetyltransferases awry. *Curr Biol* 12; R141-143.
- Lamantea E, Carrara F, Mariotti C, Morandi L, Tiranti V, Zeviani M. A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscular disorders* 12 2002 49-52.

- Lipinski ML, Yuan J. 2004. Mechanisms of cell death in polyglutamine expansion diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 4, 85-90.
- Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 1982. www.MolecularCloning.com
- Matilla-Duenas A, Goold R, Giunti P. *Cerebellum* 2008 Apr 3 (Epub ahead of print) Clinical, genetic, molecular and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type I.
- Matoba, R., Kato, K., Saito, S., Kurooka, C., Maruyama, C., Sakakibara, Y., Matsubara, K., 2000. Gene expression in mouse cerebellum during its development. *Gene* 241(1), 125-131.
- Nikali K, Suomalainen A, Saharinen J, Kuokkanen M, Spelbrink JN, Lonnqvist T, Peltonen L. Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Human Molecular Genetics*, 2005, Vol 14, n 20, p2981-2990.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P, Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:552-65.
- Park Y, Hong S Kim SJ, Kang S. Proteasome function is inhibited by polyglutamine-expanded ataxin-1, the SCA1 gene product. *Mol Cells* 2005; 19:23-30.
- Petersen OH. Calcium signal compartmentalization. *Biol Res* 2002; 35:177-82.
- Pinòs T, Marotta M, Gallardo E, Illa I, Diaz-Manera J, Gonzalez-Vioque E, Garcia-Arumi E, Andrei AL, Martí R. A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ala) gene (m.5636T>C) in a patient with progressive external ophthalmoplegia. *Mitochondrion.* 2010 Sep 8 1-6.

- Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004; 10: S10-7.
- Sciacco M, Fagiolari G, Lamperti C, Messina S, Bazzi P, Napoli L, Chiveri L, Prella A, Comi GP, Bresolin N, Scarlato G, Moggio M. Lack of apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology* 2001 Apr 24; 56(8):1070-4.
- Serra HG, Byam CE, Lande JD, Tousey SK, Zoghbi HY, Orr HT. Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2535-43.
- Spinazzola A, Zeviani M. *J of Int. Med* 2008 265;174-192. Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk.
- Tanahashi C, Nakayama A, Yoshida M, Ito M, Mori N, Hashizume Y. MELAS with mitochondrial DNA 3243 point mutation: a neuropathological study. *Acta Neuropathol.* 2000 Jan; 99 (1): 31-8.
- Tynismaa H, Suomalainen A, et al. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *PNAS* Dec 6, 2005 vol.102 n.49 pp 17687-92.
- Vandaele S, Nordquist DT, Feddersen RM, Tretjakoff I, Peterson AC, Orr HT. Purkinje cell protein-2 regulatory regions and transgene expression in cerebellar compartments. *Genes Dev* 5: 1136-1148, 1991.
- Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Riku S, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Differential somatic CAG repeat instability in variable brain cell lineage in dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA): a laser-captured microdissection (LCM)- based analysis. *Hum Genet* 2000 107: 452-457.

- Whaley N, Uitti R: Inherited ataxias. In Neurology and Child Neuroscience. Edited by: Schapira A. Philadelphia: Mosby Inc; 2007:887-897.
- Whaley NR, Fujioka S, Wszolek ZK Autosomal dominant cerebellar ataxia type1: a review of the phenotypic and genotypic characteristics. Orphanet journal of rare diseases 2011, 6: 33.
- Winterthun S, Ferrari G, He L, Taylor RW, Zeviani M, Turnbull DM, Engelsens BA, Moen G, Bindoff LA. Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. Neurology 2005;64:1204-1208.