LE NEUROPATIE OTTICHE EREDITARIE A PATOGENESI MITOCONDRIALI COME MODELLO DI NEURODEGENERAZIONE SELETTIVA

Dr. Andrea Martinuzzi
e-mail: andrea.martinuzzi@cn.lnf.it

Linea di Ricerca n. 5
Neurobiologia

Tipo di Ricerca: Finalizzata

Periodo di svolgimento: 2005-2006

Polo scientifico: Conegliano

Unità Operative e Collaborazioni
Dip. di Biologia evoluzionistica sperimentale Università di Bologna

Dip. di Scienze Neurologiche, IRCCS Ospedale Maggiore di Milano

IRCCS "E. Medea" polo regionale di Conegliano

Lab. di Neurobiologia - Clinica Neurologica Università di Milano Bicocca

Lab. di Neurogenetica Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Bologna

Obiettivi principale (ed eventuali obiettivi secondari) del progetto

1) determinazione della sequenza di eventi che porta alla morte cellule umane con mutazioni del mtDNA mitocondriale associate a LHON e mutazioni nel gene OPA1 associate ad ADOA

2) identificazione delle condizioni stressogene in grado di mimare in-vitro gli eventi osservati in-vivo, ed analisi dei possibili determinanti nella espressività del quadro patologico

3) studio dei meccanismi di neuroprotezione attivati o attivabili in vari tipi cellulari e in vivo.

Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

Le neuropatie ottiche ereditarie su base mitocondriale sono delle patologie genetiche, dovute a mutazioni sia del DNA mitocondriale che nucleare, con le caratteristiche del processo neurodegenerativo specifico per determinate classi di neuroni (Carelli et al. Prog Ret Eye Res 2004;23:53-89). Le cellule target per la neurodegenerazione sono le cellule ganglionari della retina, l'ultima stazione cellulare che proietta il proprio assone sul cervello, formando il nervo ottico. Le due forme più comuni, le cui basi genetiche sono ora note, sono la Neuropatia Ottica Ereditaria di Leber (LHON) e l'Atrofia Ottica Autosomica Dominante (ADOA). La LHON è dovuta a mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale che colpiscono differenti subunità del complesso I della catena respiratoria mitocondriale (nucleotidi 11778/ND4, 3460/ND1 e 14484/ND6). L'ADOA è associata a mutazioni che inducono aploinsufficienza nel gene OPA1, una proteina dinamino-correlata coinvolta nei processi di fissione/fusione e biogenesi del network mitocondriale.

In entrambe queste patologie i pazienti perdono la visione centrale in seguito ad una progressiva (ADOA) o acuto/subacuta (LHON) degenerazione di probabile natura apoptotica delle cellule ganglionari della retina, come indicato dall'assenza d'infiammazione e dall'inefficacia di qualsiasi terapia, inclusi gli steroidi. Le attuali conoscenze patogenetiche suggeriscono un deficit bioenergetico e/o un aumentato stress ossidativo che predispongono le cellule ad una più facile attivazione dei meccanismi di morte apoptotica, che in vivo si traduce nella degenerazione preferenziale delle fibre a piccolo calibro e scarsa mielinizzazione componenti il fascio papillomaculare. La predisposizione alla morte apoptotica sembra essere una via finale comune per la LHON e l'ADOA.
Tuttavia la disfunzione mitocondriale che sottende a questa predisposizione è diversa nelle due patologie. Nella LHON sono chiaramente documentati un deficit della sintesi di ATP con i substrati del complesso I e un incremento dello stress ossidativo. Il conseguente deficit bioenergetico può alterare il trasporto assonale della popolazione mitocondriale lungo il nervo ottico, con conseguenze patologiche prevalenti sulla parte iniziale non-mielinica e quindi altamente energia-dipendente. L' di stress ossidativo può invece avere molteplici conseguenze tra le quali una depressione nelle capacità di trasporto del glutammato e una più specifica sensibilità al danno della componente mielinica del nervo ottico. Nell'ADOA può esserci un deficit della sintesi di ATP, ed esperimenti di soppressione genica di OPA1 indicano gravi alterazioni morfologiche a carico delle cristae mitocondriali, frammentazione del network mitocondriale ed apoptosi. La frammentazione del reticolo mitocondriale potrebbe alterare l'omeostasi intracellulare degli ioni calcio, che regolano vari eventi del processo apoptotico. Quindi, una complessa interrelazione tra deficit bioenergetico, stress ossidati-

vo, eccitotossicità, organizzazione del network mitocondriale nella cellula, livelli mitocondriali di calcio e apoptosi cellulare entrano in gioco nel determinare la degenerazione delle cellulare ganglionari della retina. Questi sono anche i temi centrali in altre malattie neurodegenerative, come il Parkinson dove un difetto del complesso I ha un ruolo di primo piano, la paraparesi spastica con mutazioni nella paraplegina e difetto del trasporto assoplasmatico, alcune forme di Charcot-Marie Tooth legate a mutazioni nel gene della mitofusina, una proteina analoga all'OPA1 implicata nella fissione/fusione mitocondriale, e nella sclerosi laterale amiotrofica, dove la recente dimostrazione di un legame specifico tra SOD e Bcl-2 (Pasinelli et al. Neuron 43: 19; 2004) sembra poter spiegare la predisposizione patologica all'apoptosi dei motoneuroni spinali e corticali dei soggetti con forma familiare di SLA associata a mutazioni della Cu-Zn-SOD.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre?

L'approfondimento e la comprensione dei meccanismi che, a partire da una anomalia genetica nota, perturbando in vario e subdolo modo la funzionalità mitocondriale, conduce a quadri di morte neuronale selettiva, e la identificazione delle condizioni che ottenute da pazienti e portatori di 5 tipi diversi di mutazioni del mtDNA associate a LHON. Sono già a state sviluppate nel laboratorio del responsabile della ricerca le linee di cibridi da osteosarcoma contenenti le mutazioni 11778, 3460, 14484, 14459, 13505, e sono disponibili sempre nello stesso laboratorio linee di cibridi di controllo caratterizzate sia a livello genetico (aplotipo) che a livello funzionale.

Metodologia

Cibridi neuronali verranno ottenuti utilizzando come cellule donatrici fibloblasti da pazienti o di controllo enucleati dopo esposizione a citocalasina B (citoplasti), che verranno fusi in con una delle due linee neuronali precedentemente deplete del loro mtDNA. La deplezione verrà ottenuta dopo esposizione a rhodamina 123 per la linea NT2, dopo esposizione a bromuro di etidio per la linea SH-SY5Y. L'identità molecolare delle linee cibride ottenute verrà verificata direttamente.

Accanto alle linee di cibridi, che garantiscono un output maggiore e costante di materiale cellulare da utilizzarsi nei vari esperimenti, verranno studiati anche i fibroblasti ottenuti dai pazienti, al fine di verificare quali risposte siano direttamente conseguenza dell'assetto genetico mitocondriale, quali rappresentino una caratteristica legata al genoma nucleare, e quali infine siano conseguenza del processo di cibridizzazione. Inoltre, i fibroblasti ottenuti dai pazienti sono le uniche linee cellulari utilizzabili per lo studio delle mutazioni del gene OPA1 diagnosticate nei pazienti con ADOA. Infine la disponibilità di tessuto muscolare bioptico e di tessuto oculare e nervoso autoptico permetterà indagini immuno-istochimiche atte a valutare il danno ossidativo (nitrotirosina), e alcune attività enzimatiche (superossido-dismutasi etc.) nel tessuto selettivamente affetto dal processo neurodegenerativo (retina e nervo ottico).

Parametri di funzionalità, sopravvivenza e morte cellulare

Su tutti i tipi cellulari prima descritti verranno studiati i seguenti parametri:

1) crescita cellulare e consumo di ossigeno; 2) ATP totale; 3) trasporto del glutammato, analisi funzionale e biomolecolare presenza ed efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti sia solubili (GSH) che enzimatici (catalasi, SOD, glutatione perossidasi e reduttasi); 4) produzione di ROS e presenza di modificazione proteiche ROS dipendenti (e.g. nitrosilazione); 5) equilibrio o disequilibrio dei fattori pro- e anti-apoptotici; 6) morfologia del network mitocondriale e dinamica degli eventi di fissione/fusione; 7) dinamica e distribuzione del calcio intracellulare; 8) numero medio di molecole di mtDNA/cellula nelle diverse linee testate

Condizioni stressogene

Le seguenti condizioni, note come in grado di indurre uno stato di stress metabolico o verosimilmente in grado in particolari circostanze di determinarlo, verranno testate:

–sostituzione nel mezzo di coltura del glucosio con il galattosio

–esposizione a glutammato (per le linee NT2, sensibili al glutammato in quanto dotate di recettori)

–esposizione a testosterone

–esposizione a agenti depletori di GSH (BSO) o neurotossine

Nelle varie condizioni verranno monitorati i parametri più significativi tra quelli sopra elencati, con l'obiettivo di determinare per ogni linea e per ogni condizione

a) la sequenza di eventi culminanti in morte cellulare con riferimento a quelli che determinano la scelta delle modalità necrotica o apoptotica

b) la morfologia del network mitocondriale e la relazione con le modalità di morte cellulare in atto

c) le modalità di difesa messe in azione dalle cellule delle varie linee testate

d) i markers più efficienti in grado di monitorare la catena di eventi.

Meccanismi di neuroprotezione

Verranno testate condizioni o sostanze in grado di fornire neuroprotezione. Tra gli altri verranno testati glutatione, mi-

toQ, idebenone e altri antiossidanti, come trolox o spin trap agents, nelle linee NT2, sensibili al glutammato, verrà testata la memantina

Correlazione genotipo/fenotipo e analisi della espressività clinica

Verrà studiata una ampia popolazione di soggetti e famiglie con LHON e ADOA, con una registrazione delle condizioni associate allo svilupparsi della patologia, l'influenza di possibili modificatori genetici e ambientali, al fine di definire i fattori che determinano la variabilità della penetranza e la tessuto specificità che accomuna la LHON e la ADOA.

Trasferibilità dei risultati e dei prodotti

L'approfondimento e la comprensione dei meccanismi che, a partire da una anomalia genetica nota, perturbando in vario e subdolo modo la funzionalità mitocondriale, conduce a quadri di morte neuronale selettiva, e la identificazione delle condizioni che favoriscono o accelerano tale processo patologico o viceversa lo rallentano o contrastano, hanno ricadute che vanno ben oltre il contesto di malattia specifica nel quale lo studio si compie.

I risultati di questa ricerca potranno essere facilmente traslati a malattie ben più diffuse della LHON o della ADOA, quali PD, SLA, CMT, che presentano scenari con rilevanti parallelismi sul piano dei meccanismi patogenetici, e che quindi con le prime possono condividere molti dei passaggi cruciali e delle possibili soluzioni in termini di trattamento o prevenzione.

Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Le U.O. partecipanti sono già impegnate in una collaborazione caratterizzata da complementarietà e efficienza, come dimostrato dalla quantità e qualità della produzione scientifica. La consolidata esperienza nella creazione e manipolazione di cibridi acquisita dalla U.O. IRCCS Medea, permette grazie alla ampia popolazione di soggetti con mutazioni LHON (monitorata presso le U.O. Neurologia Bologna e Milano), sia direttamente che grazie a collaborazione con gruppi europei, di poter disporre di un ampio numero di linee testabili dal punto di vista funzionale e biochimico, con particolare attenzione ai meccanismi di induzione e regolazione di stress ossidativo e apoptosi (U.O. Biologia Bologna), di eccitotossicità e neuroprotezione (U.O. Milano Bicocca). Il tutto strettamente controllato sul piano molecolare (U.O. Milano Policlinico), anche grazie ai risultati di analisi su microarrays effettuati presso il laboratorio collaborante del Prof. Cortopassi (UC Davies).

Articolazione

Fase 1: raccolta della casistica e dei tessuti, prima sistematizzazione con analisi dettagliata delle possibili correlazioni genotipo/fenotipo (U.O. Neurologia Bologna e Policlinico Milano)

Oltre 60 gruppi familiari LHON portatori sia delle mutazioni classiche ai nucleotidi 11778/ND4, 3460/ND1, 14484/ND6 del DNA mitocondriale, che di mutazioni più rare recentemente descritte. Inoltre, sono stati diagnosticati anche alcuni gruppi familiari con ADOA portatori di specifiche mutazioni nel gene OPA1, alcune delle quali già riportate in letteratura, altre nuove. Tutti questi pazienti vengono caratterizzati clinicamente e molecolarmente, sia in termini di mutazioni patogene che di aplogruppo mitocondriale. Verrà inoltre costruito un database comune nel quale possono essere sistematicamente registrate oltre alle caratteristiche cliniche e molecolari dei pazienti, anche tutte le informazioni che possano permettere l'identificazione di parametri predittivi di penetranza e espressività delle varie mutazioni patogene.

Tutti i nuovi pazienti verranno sottoposti, previo consenso informato, a prelievo bioptico cutaneo per l'isolamento di fibroblasti.

Fase 2: costruzione delle linee cellulari e la verifica del loro status funzionale di base (UO Medea, U.O. Biologia Bologna, U.O. Neurologia Milano Bicocca),

Creazione e stabilizzazione delle linee di ibridi citoplasmatici (cibridi) da osteosarcoma: Fibroblasti verranno ottenuti previo consenso informato mediante biopsia cutanea da pazienti con quadro clinico LHON o LHON-plus, portatori di mutazioni LHON non affetti, individui di controllo. Le colture, verranno direttamente utilizzate o saranno destinate ad enucleazione (King & Attardi, Meth Enzymol. 264: 304; 1996). Per la creazione di linee cibride, i citoplasti così ottenuti verranno fusi in DMSO-PEG con cellule rho°. La successiva crescita in medium selettivo permetterà l'isolamento di cloni di cibridi che verranno sottoposti ad analisi molecolare (UO Neurologia Bologna) per confermare l'identità genetica acquisita. Nel corso del mantenimento delle linee verrà periodicamente controllata l'identità molecolare e il contenuto relativo di mtDNA.

Creazione e stabilizzazione delle linee rho° neuronali: Le linee neuronali umane NT2 e SH-SY5Y verranno sottoposte a trattamento cronico con bromuro di etidio, con rodamina 123 o con altre sostanze in grado di determinare depleziione selettiva di mtDNA, con l'obiettivo di isolare cloni interamente deprivati di mtDNA.

Creazione e stabilizzazione delle linee di cibridi neuronali: Utilizzando NT2 o SH-SY5Y rese rho° come ospiti verranno creati, con lo stesso metodo utilizzato per la linea di osteosarcoma, cibridi neuronali con le diverse varianti di mtDNA. Non essendo qui possibile la doppia selezione

(Uridina e Br-Desossiuridina), la sicurezza sulla identità nucleare dei cibridi verrà ottenuta mediante diretto controllo molecolare utilizzando polimorfismi specifici.

Determinazione dei parametri funzionali su linee sperimentali e di controllo:

Vitalità in mezzo standard e selettivo. La vitalità di fibroblasti o cibridi verrà monitorata in funzione del tempo di incubazione nel medium standard (glucosio 4.5g/l), sia in medium privo di glucosio/contenente galattosio sia nel mezzo glucosio in presenza di 1mM BSO (condizioni di stress);

Capacità di respirazione anche dopo pre-incubazione con l'inibitore del Complesso I rotenone. La respirazione cellulare verrà misurata monitorando direttamente il consumo di ossigeno in medium contenente piruvato. La medesima valutazione verrà ripetuta dopo pre-incubazione delle cellule per 4 ore in rotenone per testare la resistenza delle singole linee a questo inibitore specifico del complesso I;

I livelli di GSH e GSSG saranno misurati con il metodo enzimatico (Floreani, Free Rad Res 26: 449; 1997); l'attività della glutatione reduttasi verrà misurata con la procedura enzimatica accoppiata a glutatione reduttasi (Prohaska, J Neurochem 27: 1379, 1976), la glutatione reduttasi con il metodo di Carlberg (J Biol.Chem 150:5475; 1975), la catalasi con il metodo di Aebi (Meth Enzymol 105: 121;1984), e la SOD con il metodo di Oberlay (Meth Enzymol 105: 457, 1984). I livelli cellulari di ATP verranno determinati utilizzando il metodo della luciferina-luciferasi, utilizzando il BioOrbit ATP monitoring kit.

Dinamica e distribuzione del calcio libero cellulare in linee patologiche e di controllo.

La concentrazione di calcio libero citosolico nei fibroblasti ADOA verrà valutata con la sonda fluorescente Fura-2, in condizioni basali, mentre l'entità del deposito del reticolo endoplasmico verrà misurata dopo aggiunta di tapsigargina, inibitore delle SERCA. I livelli di calcio nei mitocondri verranno determinati dopo trasfezione dei fibroblasti con aequorina ricombinante indirizzata ai mitocondri (in collaborazione con il prof. Rosario Rizzuto, Università di Ferrara).

Efficienza dei trasportatori del glutammato nelle varie linee cellulari parentali o ripopolate con mitocondri con mtDNA mutato o di controllo. Il trasporto di glutammato sodio-dipendente ad alta affinità è stato calcolato come differenza tra le disintegrazioni per minuto (dpm), ottenute in presenza e in assenza di sodio, ed espresso come picomoli di glutammato/mg di proteine/30 minuti. La concentrazione proteica verrà determinata mediante metodo di Bradford.

Fase 3: Valutazione del morfologia del network mitocondriale e del numero medio di molecole di mtDNA/cellula nelle diverse linee testate (U.O. Biologia evoluzionistica Bologna e U.O. Neurologia Policlinico)

La morfologia mitocondriale verrà valutata sia nei cibridi/fibroblasti LHON che nei fibroblasti ADOA incubati in glucosio (con o senza BSO) o in galattosio, caricando le cellule con MitoTracker Red. La velocità della fusione mitocondriale verrà determinata dopo trasfezione delle cellule con una GFP fotoattivabile indirizzata ai mitocondri, in collaborazione con R.Y.Joule, Bethesda, mediante microscopia confocale, usando il software Metamorph/Metafluor (Karbowski M. et al., J. Cell Biol. 2004, 164, 493-499).
La velocità di fusione verrà determinata anche dopo trasfezione dei fibroblasti ADOA con il gene OPA1wt e con il dominante negativo del gene di Drp1 (Drp1-K38A) che impedisce il processo di fissione.
La proporzione di mtDNA per cellula sia su fibroblasti che cibridi verrà testata mediante quantitative PCR con primers specifici.

Fase 4: valutazione delle modificazioni, rispetto alle condizioni basali, a livello di difese antiossidanti e di equilibrio dei fattori pro- e anti-apoptotici indotte nel modello cellulare da condizioni di stress e di neuroprotezione. (U.O. Medea, U.O. Biologia Bologna, U.O. Neurologia Milano Bicocca).

La presenza, l'entità, e la sequenza temporale degli eventi cellulo-lesivi in linee parentali e cibride sia in condizioni basali che di stress verranno analizzate in questa fase.

Il variare del rapporto intracellulare GSH/GSSG, ritenuto un sensibile marker dell'efficienza delle difese antiossidanti della cellula verrà monitorato nelle varie condizioni con il metodo enzimatico. Analogamente verranno rilevate le proporzioni di residui di tirosina nitrosilata nei vari compartimenti cellulari. Le cellule verranno raccolte ed i mitocondri intatti verranno separati. Le proteine contenute nei mitocondri isolati e nella frazione citoplasmatica verranno separate in SDS-PAGE, trasferite su membrana in nitrocellulosa e esposte a anticorpi anti-nitrotirosina. La presenza e la quantità di residui tirosina nitrosilati verrà quantificata con un sistema di analisi di immagini.

I medesimi parametri verranno poi valutati in presenza di:

- condizioni o sostanze potenzialmente precipitanti il danno cellulare: inibitore della sintesi di GSH (BSO), esposizione a testosterone, a glutammato (per le linee NT2), crescita in galattosio, deplezione parziale di mtDNA.

- condizioni o sostanze potenzialmente in grado di garantire protezione. Tra gli altri verranno testati: glutatione, MitoQ, idebenone, memantina,

Verrà studiato se l'eventuale deficit energetico possa influenzare il tipo di morte a cui vanno incontro i cibridi/fibroblasti LHON nel mezzo galattosio.

Infatti, nonostante il significativo rilascio del citocromo c dai mitocondri, non è stata rilevata alcuna attivazione della caspasi-3 . Dal momento che la morfologia nucleare dei cibridi LHON è di tipo apoptotico e si è osservato DNA laddering, è possibile che si tratti di un tipo di morte caspasi-indipendente.

Il coinvolgimento di un processo autofagico con intervento di proteasi lisosomiali tipo catepsine, verrà definito determinando se la sopravvivenza cellulare sia significativamente aumentata dalla preincubazione con inibitori specifici (pepstatina A, E-64, etc.). L'eventuale rilascio di catepsine nel citoplasma, verrà analizzato mediante immunofluorescenza.

Se invece gli inibitori delle catepsine risulteranno inefficaci, analizzeremo il possibile coinvolgimento di AIF ed Endonucleasi G, verificando il loro rilascio dai mitocondri nel citoplasma, determinando i livelli nelle frazioni citosoliche e mitocondriali isolate dai cibridi LHON incubati in galattosio, mediante immunoblotting ed immunofluorescenza.

Lo studio del trasporto di glutammato verrà effettuato a livello basale, per valutare la cinetica di trasporto a diverse concentrazioni di glutammato extracellulare, e dopo esposizione agli agenti neuroprotettivi previsti nella ricerca, per valutare l'eventuale modulazione farmacologica di questo parametro, mantenendo una concentrazione di glutammato di riferimento.

Verrà infine studiata l'espressione dei trasportatori e una loro eventuale modificazione ossidativa. Quest'ultimo punto verrà effettuato mediante immunoprecipitazione di EAAT1 e immunoblot con un anticorpo specifico contro gli addotti della 4-idrossinonenale, un noto prodotto di perossidazione lipidica. Infine i composti neuroprotettivi impiegati dalle altre unità verranno testati per verificare una eventuale modulazione del trasporto di glutammato.

Fase 5

Sperimentazione dell'effetto di sostanze conferenti protezione: L'effetto di sostanze e condizioni potenzialmente protettive dallo stress ossidativo e dalla morte apoptotica verrà testato nelle diverse condizioni genetiche e nei vari contesti cellulari (fibroblasti, cibridi da osteosarcoma, linee neuronali). Le cellule saranno preincubate con le diverse molecole e poi mantenute in galattosio oppure trattate con BSO per tempi definiti. La vitalità sarà determinata mediante il saggio spettrofotometrico del MTT e la morte mediante conta dei nuclei condensati, marcati con Hoechst; composti neuroprotettivi verranno testati per verificare una eventuale modulazione del trasporto di glutammato.

Output del programma

Prodotti

- Database integrato di dati clinici e molecolari relativo alla più ampia popolazione italiana con LHON o ADOA

- Collezione di linee immortali di cellule umane con mutazioni patogeniche del mtDNA caratterizzate sia sul piano molecolare che funzionale.

- Linee immortali neuronali umane deplete di mtDNA (rho°), disponibili per la creazioni di cibridi con diverse tipologie genetiche di mtDNA.

Informazioni

- Informazioni su condizioni che in situazioni di accentuata suscettibilità geneticamente determinata od acquisita possono condurre ad attivazione di danno neuronale selettivo

- Informazioni su sostanze e condizioni che possono rappresentare elementi di protezione nei confronti delle condizioni di cui sopra

Obiettivi intermedi previsti

- caratterizzazione funzionale delle linee da osteosarcoma con tutte le diverse mutazioni patogene e le varianti polimorfe più comuni

- creazione e stabilizzazione delle linee neuronali con il medesimo repertorio di varianti del mtDNA

- strutturazione del database clinico-molecolare