Titolo: **Studio ex vivo delle interazioni tra stress ossidativo ed eccitotossicità in malattie neurodegenerative mediante ibridi citoplasmatici (CIBRIDI)**

Prof. Carlo Ferrarese

e.mail
carlo.ferrarese@unimib.it

Linea di ricerca
Neurobiologia

Tipo di Ricerca
Corrente

Periodo di svolgimento
2002 - 2003

Polo Scientifico
Bosisio Parini

Collaborazioni
Università degli Studi di Milano-Bicocca

RAZIONALE

Le alterazioni mitocondriali hanno un ruolo importante nella fisiopatologia di molte malattie neurodegenerative, essendo connesse da un punto di vista patogenetico a fenomeni quali deficit energetico, stress ossidativo, ed eccitotossicità.
In queste patologie le cellule nervose sono cronicamente esposte a livelli abnormemente elevati di ROS (reactive oxygen species), che derivano principalmente dalla disregolazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale. L'accumulo di ROS ed il deficit energetico ostacolano il trasporto intracellulare di glutammato. Tale aminoacido si accumula nello spazio intersinaptico e provoca una continua stimolazione dei recettori che può determinare morte cellulare con meccanismo apoptotico.
La sclerosi laterale amiotrofica (ALS) e la neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON) rappresentano due malattie neurodegenerative in cui diversi meccanismi concorrono a determinare un'alterata funzionalità mitocondriale.
Nella ALS familiare, ad ereditarietà prevalentemente dominante, le alterazioni della Cu/Zn superossido dismutasi (SOD1) portano ad un accumulo di ROS che, in modelli murini ed in oociti di xenopus con SOD1 mutata, determinano una selettiva inattivazione del trasportatore di glutammato GLT-1. Inoltre, il rilievo di un aumentato danno ossidativo anche nella SLA sporadica e l'osservazione di modificazioni ossidative del trasportatore di glutammato GLT-1 nel midollo spinale di pazienti SLA rafforzano l'ipotesi di una relazione causale tra stress ossidativo ed eccitotossicità. Sebbene la ALS non sia definita una malattia mitocondriale, numerose evidenze supportano la presenza di alterazioni mitocondriali nei pazienti ALS e nei modelli sperimentali della malattia. Inoltre, mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale sono presenti con maggiore frequenza nel midollo spinale di pazienti ALS rispetti ai controlli.
Nella LHON, ad ereditarietà matrilineare, l'atrofia ottica bilaterale è causata dalla perdita delle cellule ganglionari della retina a causa di mutazioni a carico di varie subunità del complesso I della catena respiratoria. Nonostante le numerose evidenze che dimostrano una disfunzione della

respirazione mitocondriale causata dalle mutazioni LHON, la fisiopatologia della degenerazione delle cellule ganglionari è ancora relativamente sconosciuta. La compromissione della funzionalità mitocondriale potrebbe alterare lo stato ossidativo della cellula, provocando la modulazione ossidoriduttiva dei trasportatori del glutammato e l'innesco della cascata eccitotossica.
Anche nelle cellule periferiche di pazienti affetti da tali patologie neurodegenerative sono state osservate alterazioni mitocondriali. E' stata riscontrata una ridotta attività del complesso IV in linfociti di pazienti affetti da ALS ed una riduzione marcata dell'attività del complesso I in mitocondri isolati da piastrine di pazienti affetti da LHON.
Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato la presenza di un'alterazione del trasporto di glutammato piastrinico in pazienti affetti da SLA (Ferrarese C. et al, Neurology 2001), nella malattia di Alzheimer (Ferrarese C. et al, Annals of Neurology 2000) e nella malattia di Parkinson (Ferrarese C. et al., Journal of Neural Transmission, 1999).
La tecnica dei cibridi (ibridi citoplasmatici) si propone di generare linee cellulari transmitocondriali derivanti dalla fusione di cellule prive di DNA nucleare, ma contenenti DNA mitocondriale, provenienti da pazienti (in genere piastrine oppure fibroblasti privati di nucleo) con linee cellulari Rho°, ovvero prive di mitocondri e metabolismo mitocondriale in quanto esposte a basse concentrazioni di bloccanti della replicazione del DNA (in genere cellule di neuroblastoma oppure osteosarcoma). L'utilizzo di cibridi si è rivelato utile nel dimostrare l'influsso di un'alterata funzionalità mitocondriale su processi metabolici cellulari mitocondrio-dipendenti e nello screening funzionale di variazioni del mtDNA in malattie neurodegenerative.
Nel morbo di Parkinson tale modello ha già consentito d'identificare un deficit del complesso I mitocondriale e contestualmente un'aumentata produzione di radicali liberi; nella malattia di Alzheimer ha permesso di dimostrare una ridotta attività della cyt-c-ossidasi con conseguente aumento dello stress ossidativo, innesco di pathways apoptotici, alterazione dell'omeostasi calcica e un aumentato contenuto e secrezione di Abeta.
Nell'unico studio finora condotto, linee di cibridi ALS presentano un funzionamento difettoso della catena respiratoria, un'aumentata produzione di ROS (ed attività degli enzimi scavengers), perturbazioni dell'omeostasi calcica ed un'alterata ultrastruttura mitocondriale, indicando che queste anomalie sono potenzialmente dovute a mutazioni o polimorfismi del mtDNA e sono sistemiche.
Gli studi con cibridi LHON hanno dimostrato un deficit della respirazione cellulare e della attività del complesso I, alterazioni nella differenziazione in fenotipo neuronale e una aumentata suscettibilità all'apoptosi Fas-dipendente.
I cibridi rappresentano un valido modello in vitro nel quale è possibile analizzare le interazioni tra la funzionalità mitocondriale dei pazienti affetti da patologie neurodegenerative e gli altri processi che possono mediare il danno cellulare, tra cui principalmente il meccanismo eccitotossico.

OBIETTIVI

Per verificare la possibile interrelazione tra stress ossidativo ed eccitotossicità, ci proponiamo di analizzare e confrontare il trasporto di glutammato in cibridi patologici e di controllo, dato che le cellule di neuroblastoma e osteosarcoma umano possiedono i principali trasportatori di glutammato.
Questo modello ci offre l'opportunità di analizzare l'effetto del DNA mitocondriale proveniente dai pazienti sulla funzionalità dei trasportatori del glutammato, la produzione di ROS, i livelli energetici e pathways apoptotiche dipendenti dai mitocondri e dallo stress ossidativo.
In particolare ci proponiamo:

1. di isolare, mediante esposizione a etidio bromuro, cloni di cellule rho° a partire da linee stabilizzate (SH-SY5Y neuroblastoma)
2. di creare una serie di linee di cibridi (neuroblastoma) a partire da piastrine di pazienti ALS e rispettivi soggetti di controllo confrontabili per età. Inoltre, verrano utilizzati linee di cibridi (osteosarcoma) provenienti da fibroblasti di pazienti LHON, già presenti nel nostro laboratorio.

3. di studiare sui cloni ottenuti:
    - la produzione di ROS endocellulari e mitocondriali
    - la variazione del trasporto di glutammato in condizioni basali
    - i livelli intracellulari di ATP
    - l'espressione e l'attività di proteine coinvolte in processi apoptotici (caspasi-3)
    - l'espressione di proteine coinvolte in processi antiapoptotici (bcl-2)

Gli stessi parametri verranno inoltre valutati, come confronto, in linee di neuroblastoma umano wild-type e transfettate con SOD1 mutanti responsabili di forme di SLA familiari, nelle quali abbiamo recentemente dimostrato un effetto della mutazione SOD sul trasporto di glutammato.