

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SCUOLA DI FARMACIA, BIOTECNOLOGIE E SCIENZE
MOTORIE

CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

Studio dell'autofagia come meccanismo patogenetico della
Neuropatia Ottica Ereditaria di Leber

Presentata da:
Michela Sgarzi

Matricola n°
0000683957

Relatore:
Chiar.mo Prof. Valerio Carelli

Correlatore:
Dott.ssa Alessandra Maresca

Sessione I
Anno accademico 2015 / 2016

Sommario

Introduzione	1
Mitocondri	1
Struttura mitocondriale	1
Funzioni mitocondriali	2
Catena di trasporto degli elettroni e OXPHOS	2
Produzione di ROS	3
Segnali apoptotici mitocondriali	4
Genoma mitocondriale	5
Genetica mitocondriale	7
Autofagia e mitofagia	8
Malattie mitocondriali	10
Neuropatia ottica ereditaria di Leber	11
Scopo della tesi	13
Materiali e metodi	14
Campioni	14
Metodi	14
Isolamento di cellule mononucleate da sangue periferico	14
Preparazione dei lisati proteici	15
Quantificazione delle proteine	15
SDS-page e Immunoblot	16
Analisi statistica dei dati	17
Risultati e discussione	18
Quantificazione dell'autofagia in PBMCs di controlli sani e pazienti LHON	18
Quantificazione della massa mitocondriale in PBMCs di controlli sani e pazienti LHON	21
Conclusioni	23
Bibliografia	25

Introduzione

1. Mitochondri

I mitocondri, organelli citoplasmatici presenti nelle cellule eucariotiche, sono strutture fondamentali per la funzionalità cellulare, implicati in primo luogo nel processo di respirazione aerobica indispensabile per il mantenimento energetico della cellula. Secondo la tesi dell'origine endosimbiontica dei mitocondri, i mitocondri derivano da batteri aerobi che sono stati inglobati in una cellula eucariote primordiale, andando a costituire i primi mitocondri ancestrali (*Margulis, 1975*). A differenza degli altri organelli citoplasmatici, e a supporto della teoria endosimbiontica, i mitocondri posseggono un proprio genoma, rappresentato da copie multiple di DNA circolare con replicazione indipendente dal DNA nucleare. Il genoma mitocondriale codifica per proteine implicate nella fosforilazione ossidativa (OXPHOS).

1.1 Struttura mitocondriale

Dal punto di vista strutturale, i mitocondri sono costituiti da un sistema di membrane suddiviso in membrana esterna (OM, Outer Membrane), membrana interna (IM, Inner Membrane), spazio intermembrana e matrice, delimitata dalla membrana interna. Il sistema di membrane è necessario per regolare il passaggio di molecole dal citoplasma all'interno del mitocondrio: se da una parte la membrana esterna è poco selettiva per il trasporto di ioni e piccole molecole, la membrana interna deve invece mantenere il gradiente elettrochimico tra spazio intermembrana e matrice, rimanendo impermeabile alla maggior parte degli ioni. La membrana interna risulta inoltre costituita da numerose pieghe e invaginazioni, le creste mitocondriali (*cristae*), visibili in microscopia elettronica e composte da segmenti tubulari e lamellari. All'interno delle *cristae* si instaura una microcompartimentazione delle macromolecole, che permette l'organizzazione e la modulazione dei complessi necessari alla OXPHOS (*Frey e Mannella, 2000; Perkins et al., 2001*).

All'interno della cellula i mitocondri sono organizzati come un network in continuo rimodellamento tramite processi di fusione e fissione; la biogenesi e la struttura di questa "rete mitocondriale" dinamica sono fortemente influenzate dalle necessità della cellula. Ad esempio, i mitocondri si frammentano all'inizio dei processi di mitosi e apoptosi, e fondono formando estese connessioni in risposta allo stress ossidativo e alla mancanza di nutrienti (*Lackner, 2014*). La localizzazione cellulare dei mitocondri è regolata dalla trama dei microtubuli citoplasmatici, cui sono strettamente associati soprattutto nei processi assonali specializzati delle cellule neuronali, ma anche in molti altri tipi cellulari di diversa derivazione (*Heggeness et al., 1978; Friedman e Nunnari, 2014*).

1.2 Funzioni mitocondriali

I ruoli dei mitocondri all'interno della cellula sono diversi, a partire dalla generazione di energia sotto forma di ATP durante il processo della fosforilazione ossidativa. Inoltre, molte vie metaboliche quali il ciclo dell'urea, il ciclo di Krebs e la β -ossidazione degli acidi grassi avvengono interamente o parzialmente all'interno dei mitocondri. I mitocondri sono implicati anche nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e nei meccanismi dell'apoptosi, nonché nell'omeostasi del calcio; hanno poi una serie di ruoli non meno importanti nel signaling cellulare e nelle risposte immunitarie contro segnali di pericolo intra- ed extracellulari, tramite l'assemblaggio dell'inflammosoma.

1.2.1 Catena di trasporto degli elettroni e OXPHOS

Il processo di sintesi di ATP sfrutta il gradiente protonico generato durante il processo di trasporto degli elettroni. L'intero meccanismo si svolge grazie a quattro complessi respiratori e all'ATP sintasi, situati a livello della membrana interna mitocondriale.

Il complesso I funziona da NADH deidrogenasi: utilizza gli elettroni ad alto potenziale del NADH, generato durante il ciclo dell'acido citrico e la β -ossidazione degli acidi grassi, per ridurre l'ubichinone (Q) a ubichinolo (QH₂) (*Schultz e Chan, 2001*). All'interno del complesso I, gli elettroni passano attraverso una serie di centri Fe-S a potenziale di riduzione sempre maggiore. Per ogni elettrone che viene trasferito in questa prima fase, il complesso I accoppia il pompaggio di due protoni contro gradiente nello spazio intermembrana (*Wikström, 1984*).

Il complesso II è la succinato deidrogenasi, uno dei componenti del ciclo di Krebs, e contribuisce al trasferimento di elettroni all'ubichinone ma senza traslocare protoni attraverso la IM (*Rustin et al., 2002; Hägerhäll, 1997*).

L'ubichinolo è un trasportatore di elettroni mobile, in grado di muoversi all'interno del doppio strato lipidico fino al complesso III, l'ubichinolo citocromo c ossido reduttasi. Il complesso III riduce il citocromo c ossidando l'ubichinolo; contemporaneamente trasferisce due protoni allo spazio intermembrana (*Berry et al., 2000*).

Il citocromo c è una emoproteina idrosolubile che trasferisce infine gli elettroni al complesso IV, la citocromo c ossidasi; quest'ultimo complesso utilizza gli elettroni per ridurre l'ossigeno molecolare a due molecole d'acqua, prelevando i protoni dalla matrice così da contribuire al gradiente elettrochimico. Inoltre, il complesso IV accoppia alla formazione dell'H₂O il pompaggio contro gradiente di un altro protone (*Saraste, 1999*).

La catena di trasporto degli elettroni porta dunque alla formazione di un gradiente protonico a cavallo della membrana interna; l'ultimo enzima, l'ATP sintasi (complesso V), è un motore molecolare in grado di sfruttare la forza proton-motrice per sintetizzare ATP, riportando i protoni alla matrice secondo gradiente (*Mitchell, 1961*).

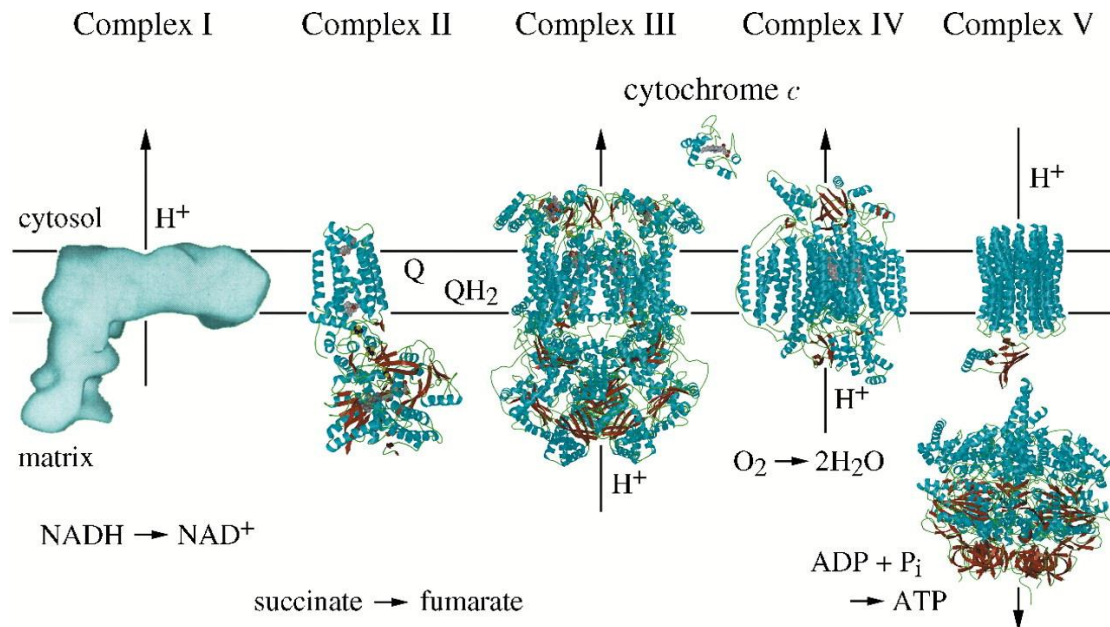


Figura 1 – Catena respiratoria mitocondriale (da *Schultz e Chan, 2001*)

1.2.2 Produzione di ROS

La produzione di ROS da parte dei mitocondri è fondamentale perché contribuisce al signaling retrogrado dal mitocondrio al nucleo e al citosol; d'altra parte i ROS sono implicati nel deterioramento mitocondriale responsabile di numerose patologie (*Murphy, 2009*). Secondo una teoria largamente accettata, è proprio la produzione eccessiva di ROS che determina l'invecchiamento cellulare, a causa dell'accumulo di mutazioni somatiche nell'mtDNA dovute allo stress ossidativo (*Lenaz, 1998*). Queste mutazioni, di natura completamente casuale e a trasmissione stocastica durante la replicazione mitocondriale, inficiano la sintesi corretta dei complessi respiratori codificati dai geni mitocondriali, portando a malfunzionamenti nel processo dell'OXPHOS. Paradossalmente, tali alterazioni possono causare un aumento nella produzione di ROS, instaurando così un circolo vizioso che contribuisce all'invecchiamento cellulare (*Ozawa, 1997*). Infatti i complessi implicati nell'OXPHOS contengono numerosi trasportatori di elettroni e centri redox che possono cedere singoli elettroni all'ossigeno, convertendolo in anione superossido (O₂⁻) (*Andreyev et al., 2005*).

Vista la tossicità di O_2^- e di un prodotto della sua dismutazione spontanea, l'ossigeno singoletto *O_2 , vi è la necessità fisiologica di un enzima che converta rapidamente O_2^- in un altro ROS meno reattivo, il perossido di idrogeno (H_2O_2). L'enzima coinvolto in questo processo è la superossido dismutasi, SOD (*Loschen et al., 1974*), ma anche il citocromo c contribuisce alla rimozione del anione superossido. O_2^- può inoltre reagire ulteriormente con l'ossido nitrico per dare lo ione perossinitrito ($ONOO^-$). Il perossido di idrogeno e le macromolecole per ossidate vengono detossificate grazie agli enzimi della famiglia delle glutazione perossidasi, che utilizzano il glutatione come fonte di equivalenti riducenti per produrre infine H_2O ; anche le catalasi, in misura minore, sono implicate nel trattamento di H_2O_2 (*Andreyev et al., 2005*).

1.2.3 Segnali apoptotici mitocondriali

L'apoptosi è una forma di morte cellulare cui la cellula può ricorrere in caso di danni cellulari consistenti; durante lo sviluppo, inoltre, molte cellule vanno incontro a morte cellulare programmata per formare la corretta architettura di tessuti e organi, utilizzando i meccanismi apoptotici (*Meier et al., 2000*). I mitocondri sono considerati i centri di controllo che regolano il processo apoptotico. Molti segnali di morte convergono a livello mitocondriale tramite la mediazione delle proteine pro-apoptotiche della famiglia di Bcl-2, che controllano il rilascio di alcuni fattori mitocondriali come il citocromo c e AIF (apoptosis-inducing factor). È noto che le Bcl-2 e le proteine Bcl-2 correlate inducono un processo di permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale (MOMP), anche se i dettagli di tale meccanismo non sono ancora stati chiariti ed esistono diversi modelli a riguardo (*Desagher e Martinou, 2000*). Il citocromo c guida l'assemblaggio dell'apoptosoma, un complesso in grado di attivare la cascata caspasi; le caspasi sono cisteina-proteasi che tramite il clivaggio dei loro substrati proteici permettono la conclusione della morte cellulare minimizzando gli effetti dannosi sulle cellule vicine ed evitando il rilascio di molecole immunostimolatorie (*Taylor et al., 2008*).

1.3 Genoma mitocondriale

Il genoma mitocondriale umano è costituito da copie multiple di una molecola circolare a doppio filamento di mtDNA, lungo 16569 bp. Il mtDNA codifica per due subunità ribosomiali (12S e 16S), per 22 tRNA e per 13 proteine coinvolte nel sistema dell'OXPHOS; i geni mitocondriali sono organizzati in modo compatto, con assenza totale di introni e una regione non codificante maggiore contenente il D-loop e sequenze di regolazione chiamata regione di controllo (*Fernández-Silva et al, 2003*). Inoltre, alcune sequenze geniche si sovrappongono, e le adenine degli stop-codons UAA non sono codificate dal mtDNA bensì aggiunte successivamente per poliadenilazione durante la processazione dell'RNA (*Scarpulla, 2008*). I due filamenti di mtDNA non sono equivalenti, ma si possono distinguere in filamento pesante (H-strand, ricco in G) e leggero (L-strand, ricco in C) in base alla loro separazione su gradiente di cesio cloruro alcalino, rappresentati rispettivamente in blu e in nero in figura 2. All'interno della regione di controllo si trovano i promotori di entrambi i filamenti (LSP, HSP1 e HSP2); le frecce mostrano la direzione della trascrizione. L'origine di replicazione del filamento H è indicata come OH, e si trova nella regione di controllo, mentre l'origine di replicazione del filamento L (OL) è localizzata all'interno di un cluster di geni codificanti per 5 tRNA (W, A, N, C, Y), e costituisce la seconda sequenza non codificante oltre alla regione di controllo. I geni indicati all'interno della mappa, ovvero ND6 e 8 geni per tRNA, sono trascritti dal filamento L, mentre quelli indicati all'esterno sono trascritti dal filamento H (*Scarpulla, 2008*).

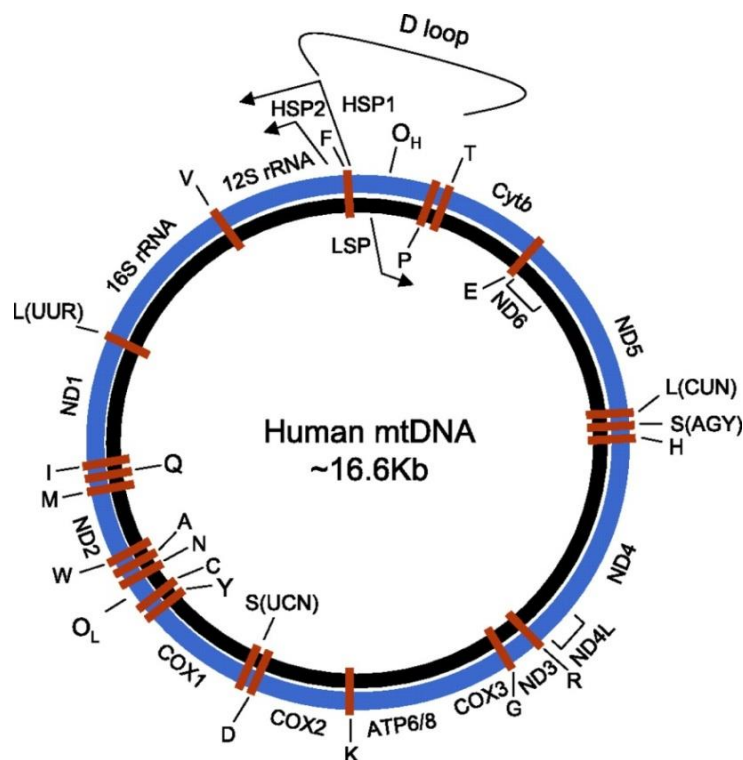


Figura 2 – Mappa del genoma mitocondriale (da *Scarpulla, 2008*)

L'organizzazione tridimensionale del mtDNA è data da sovrastrutture nucleoproteiche chiamate nucleoidi. I nucleoidi sono strutture dinamiche capaci di dividersi e ridistribuirsi all'interno del network mitocondriale, e la loro disposizione è probabilmente collegata ai meccanismi di trasmissione e segregazione del mtDNA (*Garrido et al., 2003; Legros et al., 2004*).

Uno dei componenti proteici dei nucleoidi è TFAM, un fattore essenziale per la trascrizione e la replicazione del mtDNA: la macchina trascrizionale mitocondriale è costituita infatti da solo tre componenti, ovvero la RNA polimerasi mitocondriale (POLRMT), il fattore di trascrizione mitocondriale B2 (TFB2M) e TFAM. Questi ultimi due fattori sono essenziali per la fase di iniziazione, in quanto in loro assenza la POLRMT non è in grado di avviare autonomamente la trascrizione (*Kukat e Larsson, 2013*). La terminazione della trascrizione è ad opera del fattore di terminazione mTERF. Importante notare che la maggior parte delle proteine coinvolte nei processi di trascrizione, replicazione e mantenimento del mtDNA, compresi i fattori già menzionati, sono a codifica nucleare (*Gustafsson, 2016*). Il meccanismo di trascrizione mitocondriale è tipicamente policistronico, e genera tre trascritti primari sintetizzati da tre diversi siti di iniziazione. I trascritti primari vengono quindi processati dall'endonucleasi mitocondriale RNAase P al 5', e dalla tRNAase Z al 3'; segue l'aggiunta del trinucleotide CCA al 3' per i tRNAs e la poliadenilazione per i mRNAs e i rRNAs (*Montoya et al., 2006*).

La traduzione degli mRNA maturi avviene nei mitoribosomi (MRPs); tutti gli MRPs dei mammiferi sono composti da fattori a codifica nucleare e dagli rRNA mitocondriali 12S e 16S, e la maggior parte possiede all'N-terminale una sequenza di localizzazione mitocondriale (*O'Brien, 2002*).

La replicazione del DNA mitocondriale, infine, ha luogo in maniera autonoma rispetto al ciclo cellulare, e utilizza un apparato proteico (replisoma) costituito dalla polimerasi γ , l'elicasi TWINKLE e la proteina legante il DNA mitocondriale a singolo filamento (mtSSB) (*Young e Copeland, 2016*). Le modalità secondo cui avviene la replicazione del mtDNA sono ancora poco chiare. Sono stati proposti due principali modelli: il primo, asimmetrico e asincrono, prevede il coinvolgimento di due diversi siti di origine sui due filamenti di mtDNA, con direzione di replicazione opposta (*Clayton, 1991*); il secondo modello, più recente, propone invece un meccanismo simmetrico e sincrono a partire da più forche di replicazione bidirezionali (*Holt et al., 2000; Bowmaker et al., 2003*).

1.3.1 Genetica mitocondriale

I principi della genetica mitocondriale differiscono da quelli della genetica nucleare sotto diversi aspetti.

La coesistenza di più copie di mtDNA nella stessa cellula permette l'instaurarsi di due situazioni opposte definite come omoplasma ed eteroplasma; nei tessuti normali, tutte le molecole di mtDNA sono identiche in sequenza, e in questo caso si parla di omoplasma. Quando incorrono mutazioni deleterie del mtDNA, riguardano in genere solo alcune delle copie presenti nella cellula (eteroplasma), perciò l'effettivo esito patogenetico di ogni alterazione è spesso determinato dalla percentuale di copie mutanti e wild-type nei diversi tessuti (*DiMauro e Schon, 2008*).

A differenza dei cromosomi nucleari, ereditati in maniera biparentale, il DNA mitocondriale ha una modalità di trasmissione unica e peculiare, di derivazione esclusivamente materna (*Hutchinson et al., 1974*).

L'esatta ragione dell'eredità monoparentale del mtDNA, così come le modalità tramite cui viene effettuata l'esclusione dei mitocondri paterni dopo la fecondazione, non sono ancora state chiarite. Sono stati ipotizzati meccanismi attivi di rimozione dei mitocondri spermatici, tramite ubiquitinazione e successiva eliminazione lisosomiale o proteosomale (*Sutovsky et al., 1999*). È stata inoltre dimostrata in modelli murini l'instabilità della coesistenza nello stesso embrione di materiale mitocondriale materno e paterno, seppur normale, a supporto della teoria secondo cui l'eredità matrilineare del mtDNA sia necessaria ad evitare condizioni di eteroplasma tra aplotipi diversi di mtDNA, mal tollerate dall'organismo (*Sharpley et al., 2012*). Per aplotipi mitocondriali si intendono assetti di polimorfismi stabili nel mtDNA, tipicamente differenziati su base geografica; una delle cause principali cui viene attribuita la determinazione nel tempo dei vari aplogruppi è l'alta velocità evolutiva del genoma mitocondriale, esplicita dal valore di 0.02 sostituzioni/bp ogni milione di anni. In altre parole, la velocità con cui evolve la sequenza del mtDNA è 10 volte maggiore di quella del DNA nucleare (*Brown et al., 1979*). Sebbene i polimorfismi tipici dei vari aplogruppi non siano in sé responsabili dell'insorgenza di anomalie, si possono ricondurre ad una diversa predisposizione adattativa di ogni etnia a pressioni evolutive ambientali (clima, dieta) e alle disfunzioni di origine mitocondriale, con una responsività variabile ai trattamenti terapeutici noti.

1.4 Autofagia e mitofagia

L'autofagia è il più importante pathway cellulare deputato alla degradazione delle proteine e degli organelli citosolici. Il meccanismo autofagico ha un ruolo indispensabile nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e nel turnover del materiale citoplasmatico (*Tan et al., 2013*), ma è anche implicato in diverse patologie umane, quali il cancro e le malattie neurodegenerative (*Patergnani e Pinton, 2014*). Sono state individuate due diverse tipologie di autofagia, che condividono lo step finale di demolizione proteica lisosomiale ma differiscono nella via con cui il cargo viene indirizzato al lisosoma. Nel caso della microautofagia, la membrana lisosomiale ingloba direttamente la porzione di citoplasma destinata alla degradazione, mentre la macroautofagia prevede la formazione di vescicole citosoliche (autofagosomi) che sequestrano il cargo per poi fondersi con il lisosoma e rilasciarvi all'interno il contenuto (*Levine e Klionsky, 2004*).

Dal punto di vista molecolare, i pathways autofagici sono molteplici e complessi. Hanno un ruolo centrale le proteine ATG1-ATG35, prodotte dagli autophagy-related-genes: queste proteine formano complessi funzionali che mediano i principali steps autofagici, ovvero:

- 1) Iniziazione
- 2) Elongazione
- 3) Maturazione/fusione
- 4) Degradazione

Durante l'iniziazione si ha la formazione del fagoforo, una struttura pre-autofagosomale che espandendosi ingloba la porzione di citoplasma da degradare. Questa prima fase è mediata dal complesso ULK1-ATG13-FIP200, attivato a seguito dell'inibizione di mTORC1, tipicamente dovuta a deplezione di nutrienti (*Tan et al., 2013*).

La fase di elongazione è controllata da due sistemi di coniugazione "ubiquitin-like", ovvero il ATG5-ATG12 conjugation system e il LC3-ATG8 conjugation system (*Tan et al., 2013*).

La proteina LC3 (microtubule-associated protein light chain 3), omologa nei mammiferi della proteina di lievito ATG8, viene clivata dalla cisteina proteasi ATG4 per formare il frammento LC3-I; questo si coniuga con la fosfatidiletanolamina per generare LC3-II. La fosfatidiletanolamina funge da ancora lipidica per consentire l'inserzione di LC3-II a livello della membrana dell'autofagosoma (*Thukral et al., 2015*). La proteina LC3 viene tipicamente utilizzata come marker autofagico, in quanto la sua presenza correla col numero di autofagosomi.

La fase di maturazione avviene durante il trasporto dell'autofagosoma fino al centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC), mediato da proteine come LC3-II e dineina (Marambio *et al.*, 2010). A livello del MTOC avviene la fusione con i lisosomi, e comincia lo step finale di degradazione del cargo da parte delle proteasi lisosomiali acide.

La regolazione dell'autofagia, come si è detto, può essere mediata dal pathway di mTOR, che agisce da segnale inibitorio. La via di mTOR viene inattivata dalla mancanza di nutrienti, da bassi livelli energetici o da segnali di danno al DNA: in tutti questi casi è necessario innescare i meccanismi dell'autofagia. Altri pathway regolatori mTOR-indipendenti sono una via mediata da AMPK (AMP chinasi), stimolatoria per l'autofagia, e una via ciclica mediata da IP₃ che al contrario la disattiva (Tan *et al.*, 2013).

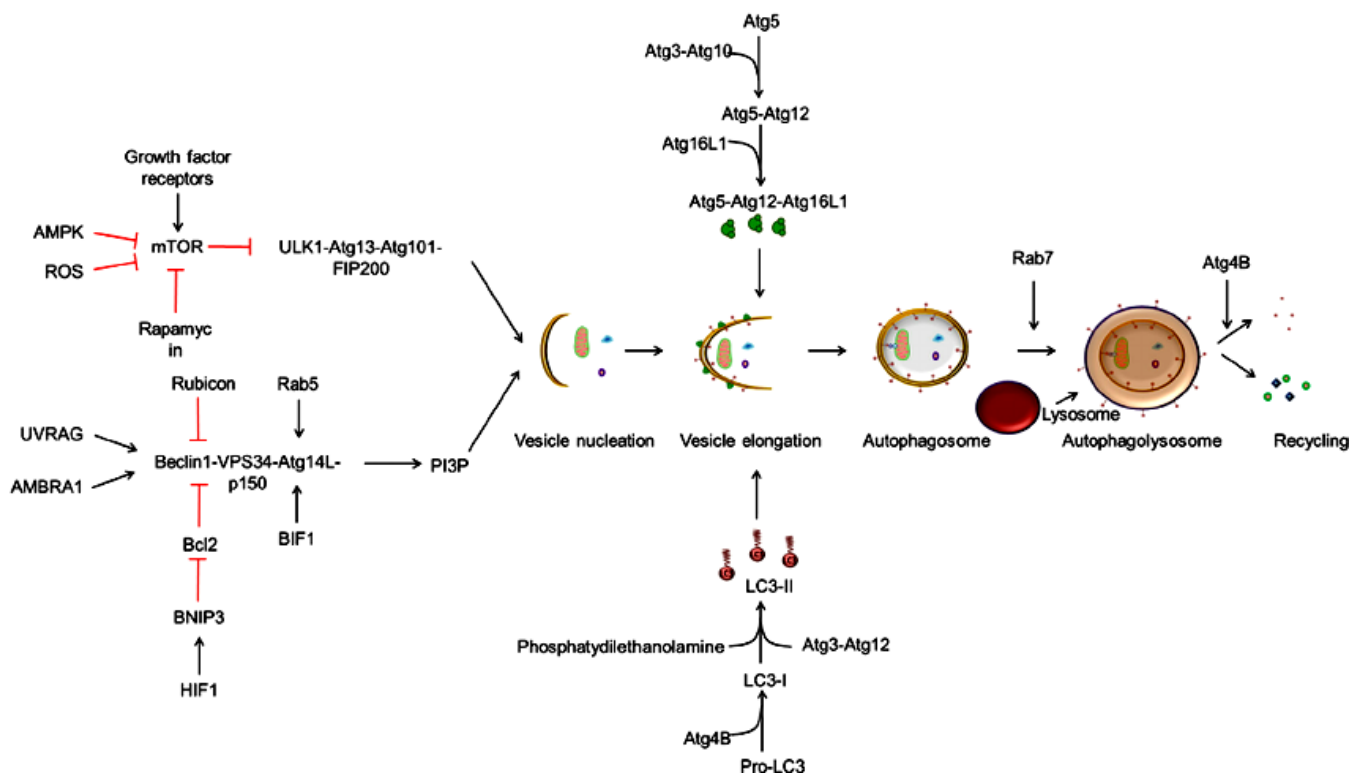


Figura 3 – Principali pathways autofagici (da Maes e Agostinis, 2014)

Un secondo marker utilizzato nel monitoraggio dell'autofagia è p62/SQSTM1. La proteina p62, anche chiamata sequestosoma 1 (SQSTM1), viene infatti degradata dall'autofagosoma grazie ad un'interazione con LC3, e la sua quantità è dunque inversamente proporzionale al livello di autofagia cellulare (Katsuragi *et al.*, 2015).

Inizialmente l'autofagia è stata considerata un processo casuale, ma negli ultimi anni si sta affermando la teoria secondo cui per alcuni organelli, quali mitocondri e perossisomi, sia prevista una forma di autofagia selettiva (*Lemasters, 2005*). Nel caso dei mitocondri, si parla di “mitofagia”: essa funziona da meccanismo di controllo qualità dell'assetto mitocondriale, eliminando i mitocondri superflui o danneggiati (*Patergnani e Pinton, 2014*). La mitofagia viene inoltre sfruttata durante lo sviluppo dei reticolociti in eritrociti, per l'eliminazione programmata dei mitocondri (*Schweers et al., 2004*).

2. Malattie mitocondriali

Le patologie mitocondriali sono caratterizzate da deficit delle funzioni mitocondriali, in particolare nei meccanismi dell'OXPPOS o nella dinamica del network mitocondriale. Nel tempo sono state ricondotte ad un'eziologia mitocondriale moltissime patologie, tipicamente ereditate per via materna e manifestate come encefalomiopatie (*DiMauro e Davidson, 2005*).

Le disfunzioni a livello della catena respiratoria possono essere dovute a mutazioni nel mtDNA, di origine sporadica o a trasmissione materna, ma anche a mutazioni nel DNA nucleare (nDNA) in geni che codificano per proteine mitocondriali (*DiMauro e Schon, 2008*).

L'insorgenza dei sintomi clinici, così come la variabilità fenotipica e la penetranza di queste patologie, è regolata da diversi fattori: ad esempio, spesso i sintomi della malattia conclamata insorgono solo quando la quota di copie di mtDNA mutate rispetto a quelle wild type, in condizioni di eteroplasmia, raggiunge un certo valore soglia (*threshold effect*). È stato inoltre osservato un effetto “a collo di bottiglia” (*bottleneck*) nella segregazione del mtDNA eteroplasmico: in una parte della progenie, spesso si stabilisce un ritorno all'omoplasmia dopo alcune generazioni (*Tuppen et al., 2010*). L'esatta natura dei meccanismi alla base di questo bottleneck genetico non sono ancora stati chiariti, ma probabilmente concerne la replicazione preferenziale di un sottogruppo di mtDNAs durante l'oogenesi (*Jenuth et al., 1996*).

La prima patologia associata ad una mutazione nel DNA mitocondriale è la neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON) (*Wallace et al., 1988*), ma oggi sono note varie sindromi correlate a delezioni (sindrome di Pearson, sindrome di Kearns-Sayre) o a mutazioni puntiformi (MELAS, MERFF) del mtDNA. Altre patologie mitocondriali molto studiate, come l'atrofia ottica autosomica dominante (ADOA), sono state invece ricondotte a mutazioni nel nDNA.

2.1 Neuropatia ottica ereditaria di Leber

La neuropatia ottica ereditaria di Leber è una patologia neurodegenerativa del nervo ottico, ereditata per via materna e dovuta a mutazioni puntiformi nel mtDNA, in geni che codificano per subunità del complesso respiratorio I (*Wallace et al., 1988*).

La LHON colpisce generalmente giovani adulti maschi, e secondo alcuni studi epidemiologici rappresenta la malattia mitocondriale più frequente (*Man et al., 2003*).

A differenza di altre patologie mitocondriali, la LHON presenta un quadro clinico non sindromico, limitato alle cellule gangliari retiniche (RGCs) (*Carelli et al., 2004*). Tipicamente si manifesta come una rapida perdita della visione centrale, in genere bilaterale, e nelle fasi iniziali si manifesta con alterazioni nella visione dei colori e scotoma centrale. La perdita dell'acuità visiva si stabilizza entro un anno dall'insorgenza della malattia, ma in molti pazienti l'espansione dello scotoma centrale continua nell'arco dei successivi anni portando alla completa cecità (*Maresca et al., 2012*).

La LHON è stata associata a diverse alterazioni del mtDNA, ma il 90-95% dei casi in tutto il mondo sono ascrivibili a tre mutazioni puntiformi:

- 11778/MT-ND4
- 3460/MT-ND1
- 14484/MTND6

Il rimanente 10% è imputato a mutazioni più rare, in genere su MT-ND6 e MT-ND1 (*Yu-Wai-Man et al., 2011*). Queste alterazioni, che nella maggior parte dei casi sono omoplasmiche, non rendono ragione della prevalenza maschile degli affetti, così come della penetranza incompleta in famiglie portatrici di una mutazione della LHON. Per questo, è stato ipotizzato l'intervento di ulteriori determinanti genetici, quali il background di mtDNA, e dunque l'aplogruppo di appartenenza, l'intervento di loci nucleari recessivi X-linked, che spiegherebbero la prevalenza maschile (*Bu e Rotter, 1991*), e infine il ruolo di fattori ambientali quali tabacco e alcool (*Carelli, 2002; Giordano et al., 2015*). Ad oggi, però, l'unica associazione conclamata è stata riscontrata con il background mitocondriale europeo, l'aplogruppo J, che aumenta la penetranza di alcune mutazioni della LHON (*Carelli et al., 2006*). Dal punto di vista biochimico, le mutazioni causative della LHON producono un difetto nel CI: studi condotti su ibridi hanno osservato una riduzione nella sintesi di ATP mediata da CI, mentre non risulta diminuita la sintesi mediata dal CII né il contenuto cellulare di ATP, a indicare un probabile meccanismo compensatorio (*Baracca et al., 2005*). Resta ancora da chiarire il motivo per cui l'efficienza respiratoria del complesso I sia equiparabile nelle cellule dei pazienti affetti e in quelle dei carrier (*Man et al., 2002*).

Sono stati associati alle mutazioni della LHON anche un aumento dello stress ossidativo (*Floreani et al., 2005*) e un' aumentata sensibilità delle cellule ad avviare i processi apoptotici (*Ghelli et al., 2003*). Infine, nella LHON così come in molte patologie mitocondriali, si instaura un meccanismo compensatorio dato dall' aumento della biogenesi mitocondriale, più evidente nei carrier rispetto ai pazienti affetti: l' incremento della mitobiogenesi potrebbe dunque essere responsabile della penetranza incompleta che caratterizza questa patologia (*Giordano et al., 2014*).

Per quanto riguarda l' approccio terapeutico alla LHON, il farmaco ad oggi più usato è l' idebenone, un analogo dell' ubichinone, che in associazione con vitamina B2 e C accelera il recupero della visione in alcuni pazienti affetti (*Mashima et al., 2000; Klopstock et al., 2011; Carelli et al., 2011*).

Scopo della tesi

Nonostante i numerosi studi, il meccanismo patogenetico alla base della LHON non è ancora del tutto chiarito. Il difetto indotto dalle mutazioni LHON a livello della catena respiratoria, spiega in parte l'eziopatogenesi della malattia dal punto di vista biochimico, ma non rendono ragione dei fenomeni di penetranza incompleta ed espressività variabile caratteristici della malattia. Negli ultimi anni, la ricerca si è concentrata sull'influenza delle mutazioni LHON nell'omeostasi mitocondriale, regolata dai processi contrapposti di mitobiogenesi e autofagia. È stata individuata una correlazione tra biogenesi mitocondriale e l'effettivo sviluppo della malattia, per cui gli individui carrier LHON dimostrano una maggiore efficienza di mitobiogenesi rispetto ai pazienti affetti, indicando quindi che l'aumento del numero di mitocondri e della quantità di mtDNA sia compensatorio della deficienza mitocondriale (*Giordano et al., 2014*). A seguito dei risultati di questi studi, l'indagine è stata indirizzata sul ruolo di autofagia e mitofagia nella patogenesi della LHON. Dati preliminari condotti *in vitro* su fibroblasti e ibridi con le tre principali mutazioni LHON, hanno dimostrato un incremento nella quota di LC3-II e una significativa riduzione nei livelli di p62, indicando un aumento di autofagia dovuto alle mutazioni LHON. L'equilibrio che si viene a instaurare tra mitobiogenesi e autofagia potrebbe dunque essere determinante nella patogenesi della LHON: nei carrier, un ingente aumento della mitobiogenesi è bilanciato da una modesta attività autofagica, non sufficiente ad annullare l'effetto positivo della prima; nei pazienti affetti invece, l'aumento della mitobiogenesi, inferiore rispetto a quello riscontrato nei carrier, è sovrastato dal processo autofagico, che risulta maggiormente attivato rispetto a controlli e carrier. Ne consegue che le cellule dei pazienti affetti contengano un numero inferiore di mitocondri, con scarsa funzionalità a causa delle alterazioni nel complesso I, mentre le cellule dei carrier sono salvaguardate dall'effetto protettivo della mitobiogenesi.

Il coinvolgimento dell'autofagia come meccanismo patogenetico della LHON, apre nuove strade dal punto di vista terapeutico: potrebbero essere impiegati nel trattamento della LHON composti inibitori dell'autofagia già sfruttati nella cura di altre patologie. Alcuni di questi farmaci, come la 3-metiladenina (3-MA), agiscono a livello della fase precoce del pathway autofagico, ma quelli maggiormente utilizzati, come cloroquina (CQ) e idrossicloroquina (HQ), inattivano vari passaggi delle fasi tardive.

I modelli *in vitro* finora utilizzati presentano una serie di limitazioni, quali l'immortalizzazione cellulare e la mancanza del background nucleare del paziente nel caso dei ibridi; lo scopo di questo progetto di tesi è quello di confermare l'incremento dei livelli di autofagia in cellule del sangue estratte *ex-vivo* dai pazienti LHON, affetti e carrier, tramite Western Blotting con anticorpi diretti contro LC3-II e p62.

Materiali e metodi

1. Campioni

I campioni analizzati per questo progetto derivano da pazienti LHON affetti e carrier, e individui di controllo. I pazienti LHON presi in esame sono portatori della mutazione omoplasmica 11778/MT-ND4. I campioni sono stati raggruppati in quattro categorie, descritte in tabella 1.

Status	Terapia	Sesso		Età media al prelievo
		M	F	
AFFETTI (n° = 4)	Non trattati	3	1	40
AFFETTI (n° = 5)	Idebenone	3	2	37
CARRIER (n° = 5)	Non trattati	2	3	33
CONTROLLI (n° = 6)	Non trattati	3	3	38

Tabella 1 – Classi dei campioni esaminati

2. Metodi

2.1 Isolamento di cellule mononucleate da sangue periferico

Per l'isolamento delle PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) dai prelievi è stato utilizzato un protocollo di separazione mediante centrifugazione su gradiente di densità. 9 ml di sangue di ogni campione sono stati inizialmente diluiti 1:2 in PBS pre-riscaldato a 37°C e successivamente stratificati su un ugual volume di una soluzione commerciale (Histopaque[®]-1077, Sigma-Aldrich), e centrifugati per 30' a 400g. Durante la centrifugata le cellule più pesanti dell'Histopaque (ovvero eritrociti e piastrine) si stratificano sul fondo, mentre sopra all'Histopaque si forma l'anello di PBMC e sopra ancora rimane il plasma. È stato prelevato l'anello di PBMC e sono state eseguite due centrifugate di lavaggio a 4°C alla velocità di 250g per 10', aggiungendo alle cellule prima 10 poi 5 ml di PBS freddo. La refrigerazione è essenziale per evitare l'attivazione delle proteasi cellulari e la conseguente degradazione proteica; anche i passaggi successivi sono stati eseguiti in ghiaccio. L'ultimo lavaggio è stato svolto con 1 ml di PBS e microcentrifuga refrigerata (4°C) per 10' a 2000 rpm. I pellet sono stati raccolti e conservati a -80°C fino al momento della lisi.

2.2 Preparazione lisati proteici

I pellet di PBMC collezionati sono stati lisati con una mix di reazione composta da:

- Buffer di lisi: RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 1% NP-40; 0.5% Na deossicolato; 0.1% SDS; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 50 mM NaF)
- Inibitori delle proteasi (IP) 1x

Il volume di mix per ogni campione è stato scelto in base alle dimensioni del rispettivo pellet.

Dopo 15' di incubazione in ghiaccio, sono stati effettuati due cicli di congelamento-scongelo dei campioni, al fine di incrementare i livelli di lisi. Un'ultima microcentrifuga a freddo a 13000 rpm è stata eseguita per precipitare i detriti cellulari indesiderati nel pellet, così da mantenere in sospensione nel soprannatante solo l'estratto proteico.

2.3 Quantificazione delle proteine

Gli estratti proteici ottenuti al termine della lisi sono stati quantificati con metodo Bradford (*Bradford, 1976*). Questo protocollo prevede l'utilizzo di un colorante verde-marrone che vira al blu in dipendenza alla concentrazione di proteine della soluzione con cui viene a contatto. La curva standard è stata preparata con diluizioni seriali di BSA (Albumina Sierica Bovina) 10 mg/ml a concentrazione nota, mentre i campioni sono stati diluiti 1:2 nel buffer di lisi (RIPA buffer). Sono state infine preparate in doppio le seguenti diluizioni, come da protocollo:

- Bianco: 3 µl RIPA buffer + 3 µl acqua bidistillata
- Curva standard: 3 µl BSA (diluizioni seriali) + 3 µl RIPA buffer
- Campioni: 3 µl campioni (diluiti 1:2) + 3 µl acqua bidistillata

Ad ogni aliquota è stato aggiunto 1 ml di colorante Bradford; ciascuna soluzione è stata quindi caricata su piastra da 96 pozzetti e l'assorbanza è stata misurata al lettore di piastre (EnSpire® - PerkinElmer). L'output dello strumento è stato elaborato su Excel per ricavare l'andamento della curva standard; quindi la concentrazione dei campioni incogniti è stata determinata con la formula $[] = \frac{A}{\epsilon \cdot V_c} \cdot f_d$, dove A rappresenta l'assorbanza ottenuta, ϵ il coefficiente di x nell'equazione della curva standard, V_c il volume di campione caricato (3 µl) e f_d il fattore di diluizione.

2.4 SDS-page e Immunoblot

Dopo l'estrazione e la quantificazione dei campioni, questi sono stati caricati su gel di poliacrilammide per effettuare la separazione delle varie proteine cellulari tramite corsa elettroforetica. Le proteine vengono separate in base al peso molecolare, e un marker costituito da una miscela proteica a composizione nota consente di confrontare le bande e ricostruire la presenza delle proteine di interesse. Sono stati diluiti 30 µg di proteine per ogni campione in 3.75 µl di NuPAGE® LDS Sample Buffer 4x (Life Technologies), 1.5 µl di NuPAGE® Sample Reduction Agent 10x (Life Technologies) e acqua distillata fino ad un volume finale di 15 µL. Il volume di estratto proteico da caricare per ottenere 30 µg di proteine è stato calcolato per ogni campione in base ai risultati della quantificazione. Dopo un'incubazione per 10' a 70°C, che favorisce la denaturazione delle proteine, ogni campione è stato caricato su gel pre-cast NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Glicina (Life Technologies); il marker (Dual Color, Biorad) è stato caricato a un volume di 10 µL. Il gel è stato quindi sottoposto a campo elettrico (100-120 V) per avviare la corsa elettroforetica della durata di due ore; è stato impiegato il buffer di corsa MOPS SDS Running Buffer 1x, all'interno del dispositivo XCell SureLock® (Life Technologies). Al termine della corsa, il contenuto del gel è stato trasferito su membrana di nitrocellulosa (0,22 mm BioRad) tramite il sistema Mini PROTEAN® Tetra System (BioRad); è stato utilizzato come buffer di trasferimento una soluzione di Transfer Buffer 1x (Tris/Glycin Buffer, BioRad), etanolo assoluto 20% e acqua distillata. Il trasferimento è avvenuto a 100 V per un ora in refrigerazione. Per bloccare i legami aspecifici degli anticorpi alla membrana di nitrocellulosa, essa è stata immersa per un'ora in una soluzione di latte al 5% in TBS-TWEEN 1x (Tris-HCl 0.02M, NaCl 0.137M, pH 7.6; TWEEN 20 0.05%). La membrana è stata quindi incubata con l'anticorpo primario in agitazione per due ore a temperatura ambiente, o in alternativa overnight a 4°C. È stato eseguito un successivo lavaggio rapido con TBS-TWEEN 1x, e in sequenza altri due lavaggi di 10' in agitazione. Segue l'incubazione di un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario, sempre in agitazione, quindi i tre lavaggi effettuati come nel caso dell'anticorpo primario. L'anticorpo secondario è stato diluito 1:5000 in una soluzione di latte al 5%. Grazie al dispositivo apposito (Odyssey® Fc Imaging System, Li-Cor), è stata rilevata l'emissione dei fluorofori coniugati all'anticorpo secondario, a 800 nm e 700 nm (a seconda del tipo di anticorpo secondario utilizzato, rispettivamente Anti-Mouse o Anti-Rabbit).

Gli anticorpi utilizzati per i Western Blotting sono elencati in tabella 2.

Anticorpi primari	Anticorpi secondari
Anti-LC3B (Sigma Aldrich) 1:1000 e 1:500 (Rabbit)	IRDye 680 Goat Anti-Rabbit (Li-Cor), 1:5000
Anti-Actin (Abcam) 1:1000 (Rabbit)	
Anti-p62 (BD Transduction Laboratories) 1:3000 (Mouse)	IRDye 800 Goat Anti-Mouse (Li-Cor), 1:5000
Anti-SDHA (Invitrogen) 1:10000 (Mouse)	
Anti-COX IV (Life Technologies) 1:1000 (Mouse)	
Anti-GAPDH (Sigma Aldrich) 1:20000 (Mouse)	

Tabella 2 – Anticorpi

2.5 Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con il software Graphpad, tramite il test One-Way ANOVA e il test di Dunnett per i confronti multipli tra categorie (controlli, affetti trattati, affetti non trattati, carrier); i dati sono stati considerati significativi con P value < 0,05.

Risultati e discussione

1. Quantificazione dell'autofagia in PBMCs di controlli sani e pazienti LHON

L'analisi dell'autofagia è stata condotta tramite Western Blotting delle proteine LC3 e p62, in estratti proteici di PBMCs derivanti da controlli sani (n=6), pazienti LHON affetti (n=9) e carrier (n=5) portatori della mutazione omoplasmica 11778/MT-ND4. I pazienti LHON affetti comprendevano inoltre 5 soggetti in trattamento con idebenone. La figura 4 mostra un risultato rappresentativo delle prove effettuate.

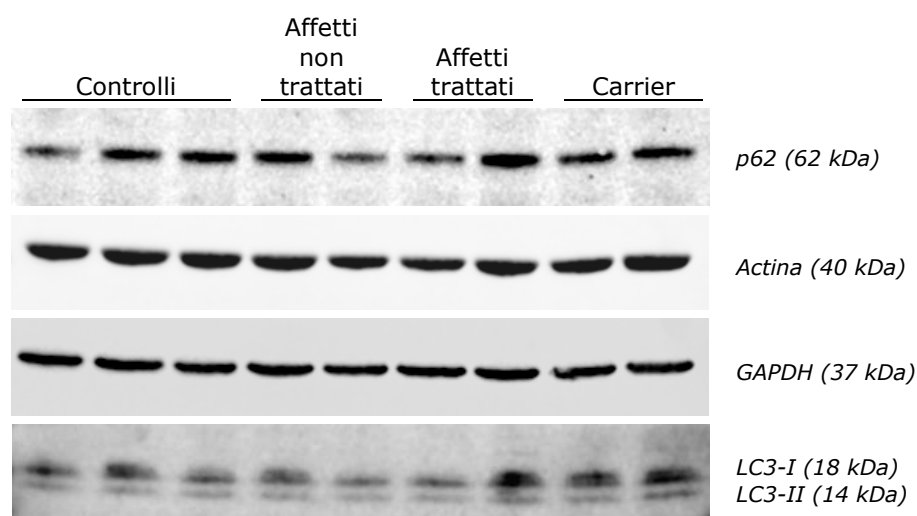


Figura 4 – Western Blotting rappresentativo dei lisati ottenuti da campioni di controllo e pazienti. Sono stati caricati 30 µg di estratto proteico per ogni campione. Le proteine actina e GAPDH, sono state utilizzate come normalizzatori per le proteine oggetto di indagine, p62 e LC3.

Per quanto riguarda LC3, il pattern di bande atteso è stato correttamente visualizzato, con una banda più alta corrispondente a LC3-I (18 kDa) e una più bassa corrispondente a LC3-II (14 kDa); anche la banda relativa a p62 (62 kDa) è stata rilevata nella posizione attesa.

La quantificazione dei livelli proteici di p62 e delle bande corrispondenti alle due forme di LC3 è stata effettuata tramite analisi densitometrica e normalizzazione sulla quantità di due diverse proteine di riferimento (*housekeeping*), actina e GAPDH. Tutti i dati mostrati nei grafici seguenti sono stati normalizzati sull'espressione della proteina di riferimento GAPDH.

Il grafico in figura 5A riassume i risultati ottenuti per la proteina LC3; viene inoltre mostrato il rapporto tra il livello di LC3-II e il livello di LC3-I, così da individuare in controlli, LHON affetti e LHON carrier un eventuale aumento o riduzione della forma lipidata di LC3 rispetto a quella non lipidata. Per quanto riguarda p62, i risultati ottenuti per densitometria sono riportati nel grafico in figura 5B.

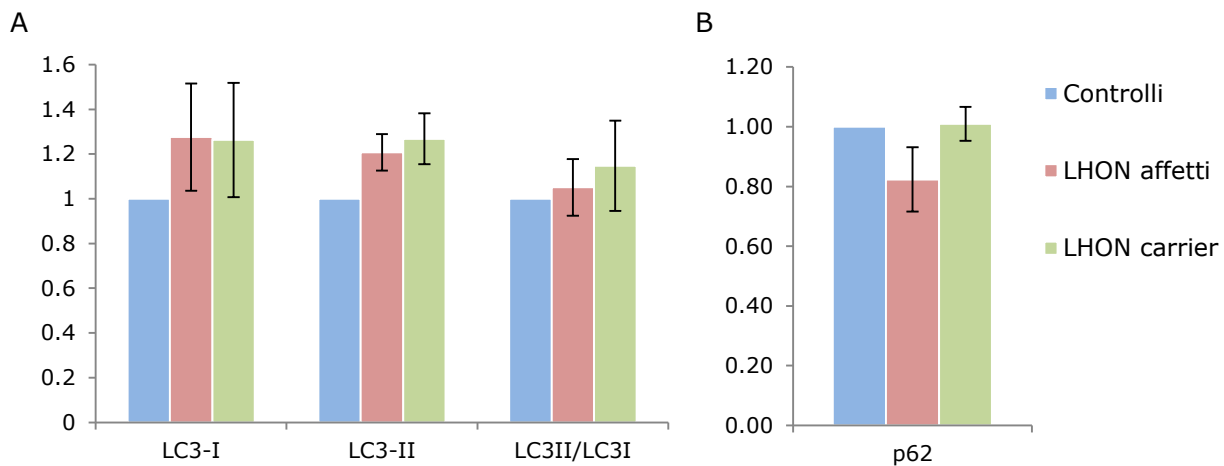


Figura 5 – Livelli proteici di LC3 e p62. (A) Il grafico mostra i dati ottenuti dall’analisi densitometrica di LC3-I e LC3-II, e il loro rapporto. Viene presentato per ogni categoria (controlli, LHON affetti e LHON carrier) il valore medio di 2 esperimenti e l’errore standard. La quota di LC3-I e di LC3-II riscontrata in affetti e carrier nelle varie prove, è stata quindi rapportata ai controlli (il cui valore è stato assunto come 1) dello stesso gel. (B) Il grafico presenta il risultato dell’analisi densitometrica mostrando per ogni categoria il valore medio di 3 esperimenti e l’errore standard. Anche in questo caso ogni dato è stato rapportato ai controlli.

Come si può osservare dal grafico 5A, sebbene risulti un leggero aumento di entrambe le forme di LC3 negli individui LHON, affetti e carrier, il rapporto tra le due è molto simile in tutte le categorie analizzate, ed eventuali differenze riscontrate non sono statisticamente significative.

Nel caso di p62, per quanto sia evidente una riduzione della proteina negli affetti rispetto ai controlli, tale diminuzione non risulta statisticamente significativa a causa della variabilità riscontrata tra i campioni delle tre categorie analizzate.

Un’ulteriore analisi è stata effettuata suddividendo la categoria degli affetti in due gruppi, rappresentati dagli affetti in terapia con idebenone (n=5) e gli affetti non trattati (n=4). L’esito ottenuto sia nel caso di p62 che di LC3 è riassunto nei grafici in figura 6.

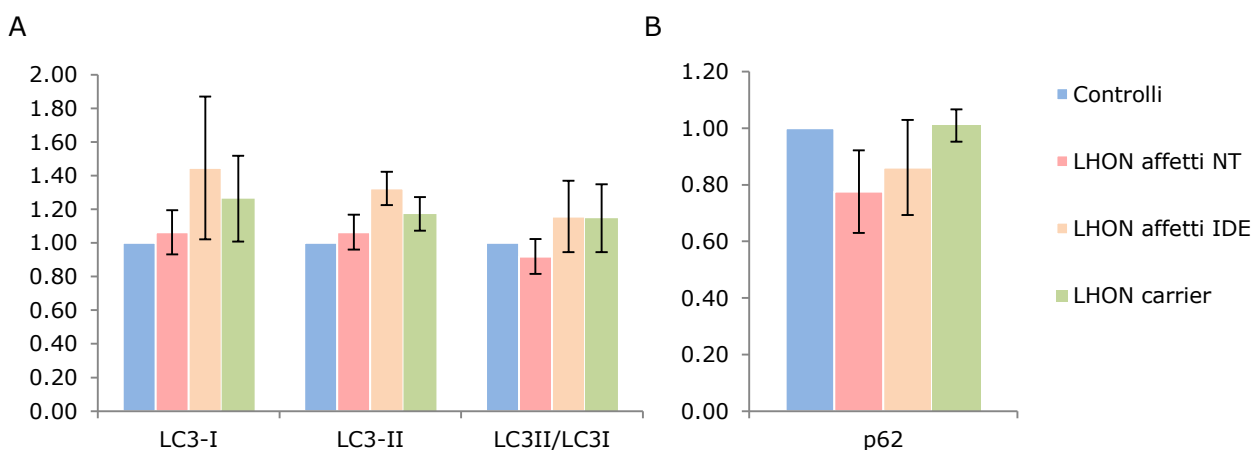


Figura 6 – Livelli proteici di LC3 e p62: distinzione tra affetti trattati e non trattati. (A) Come nei grafici precedenti, è riportata la media e l’errore standard dei dati ottenuti dall’analisi densitometrica di LC3-I e LC3-II per ogni categoria (controlli, affetti non trattati, affetti trattati con idebenone, carrier), e il rapporto LC3-II/LC3-I. Tutti i dati sono stati rapportati ai controlli. (B) Il grafico mostra media ed errore standard dei dati di p62 per ogni categoria (controlli, affetti non trattati, affetti trattati con idebenone, carrier). Anche in questo caso è stato determinato il rapporto rispetto ai controlli per migliorare l’attendibilità dell’analisi.

Entrambi i grafici riassuntivi non mostrano differenze significative tra le diverse classi, anche a causa della forte variabilità visualizzata dall'errore standard, e dovuta probabilmente al ristretto numero di campioni analizzati. Per quanto riguarda LC3, come nella prima analisi effettuata, eventuali differenze nel valore assoluto di LC3-I o LC3-II tra le varie categorie, vengono a mancare esaminando il rapporto LC3-II/LC3-I, a indicare una variazione nella quantità totale della proteina ma non nella relazione tra le due forme.

I risultati ottenuti non hanno mostrato evidenze significative di un incremento del flusso autofagico nei pazienti affetti.

Durante l'elaborazione dei dati è stato calcolato il rapporto tra LC3-II e LC3-I, in quanto un aumento di LC3-II può non essere indicativo di un incremento dell'autofagia se considerato singolarmente: la quantità totale di LC3 non è infatti rappresentativa dell'efficienza del flusso autofagico, al contrario del livello di LC3-II rapportato a LC3-I (*Klionski et al., 2016*). È importante sottolineare che il pattern di conversione di LC3-I in LC3-II è tessuto-specifico, e che la scarsa stabilità di queste proteine, specialmente LC3-I, può alterare le indagini condotte tramite Western Blot. La tendenza generale, come mostrato dai grafici in figura 5, è quella di un leggero incremento del rapporto LC3-II/LC3-I nei portatori delle mutazioni LHON rispetto ai controlli; i carrier, però, mostrano lo stesso livello di LC3-II/LC3-I, se non maggiore, degli affetti. Questo andamento è visibile anche distinguendo le categorie di affetti trattati e non trattati, ma il trattamento con idebenone sembra addirittura aumentare il livello di autofagia; occorre però notare che la suddivisione in più gruppi determina una riduzione eccessiva del numero di campioni per categoria, aumentando ulteriormente la variabilità fino a livelli troppo elevati per ipotizzare un trend attendibile. Per quanto riguarda p62, i dati rispecchiano i risultati attesi, con una diminuzione nel livello di p62, e dunque un'attivazione dell'autofagia, più evidente negli affetti rispetto a carrier e controlli (figura 5B). Tendenzialmente, inoltre, l'idebenone sembra indurre un aumento di p62, corrispondente ad un calo del flusso autofagico, come si può osservare dal grafico in figura 6B. Questo andamento non è però supportato da una significatività statistica, e occorrerebbe dunque approfondire l'analisi con un numero maggiore di campioni e ulteriori esami in parallelo per validare i risultati.

2. Quantificazione della massa mitocondriale in PBMCs di controlli sani e pazienti LHON

Al fine di confermare l'incremento della massa mitocondriale che si verifica nei portatori delle mutazioni LHON (individuato come possibile meccanismo compensatorio nei portatori sani in *Giordano et al., 2014*), e come parametro di confronto rispetto ai risultati conseguiti dall'analisi dell'autofagia, sono stati effettuati Western Blotting per due proteine mitocondriali, SDHA e COX IV. La prima corrisponde alla subunità A della succinato deidrogenasi, e la sua quantificazione consente dunque di misurare il livello del complesso II nella membrana interna mitocondriale. Gli anticorpi diretti contro COX IV (citocromo c ossidasi), invece, permettono la quantificazione del complesso IV, enzima terminale della catena respiratoria; anche COX IV si trova a livello della membrana interna. La figura 5 presenta un Western Blotting rappresentativo di COX IV e SDHA, e della proteina di riferimento GAPDH.

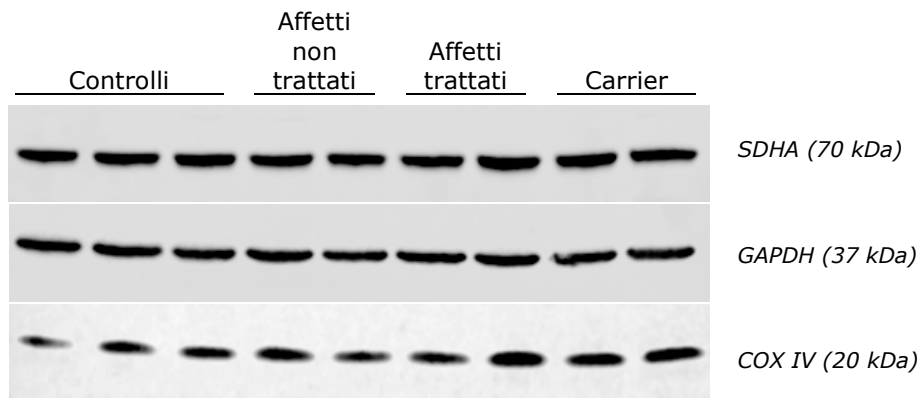


Figura 5 - Western Blotting rappresentativo dei lisati ottenuti da campioni di controllo e pazienti. Sono stati caricati 30 μ g di estratto proteico per ogni campione. La proteina GAPDH è stata utilizzata come reference per la quantificazione delle proteine in esame, SDHA e COX IV.

I livelli di SDHA e COX IV sono stati quantificati per analisi densitometrica delle bande; ogni dato è stato normalizzato sulla quantità della proteina reference GAPDH. Il grafico in figura 7A presenta i risultati ottenuti dall'analisi densitometrica di COX IV, il grafico in figura 7B di SDHA.

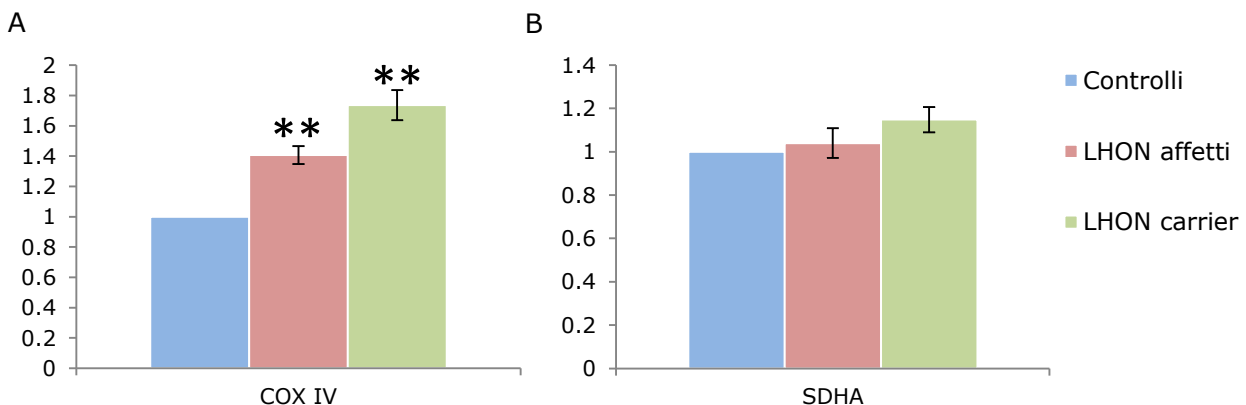


Figura 7 – Livelli proteici di COX IV e SDHA. (A) Il grafico riporta media ed errore standard dei dati per ogni categoria. I dati sono stati rapportati ai controlli. I doppi asterischi (**) indicano un livello di significatività pari a $P < 0,01$, calcolato tramite test di Dunnett. (B) Il grafico mostra media ed errore standard per ogni categoria; i dati sono stati normalizzati rispetto ai controlli.

In entrambi i grafici risulta evidente la tendenza ad un aumento della proteina negli individui affetti e carrier rispetto ai controlli. Nel caso di COX IV questo andamento è significativo anche dal punto di vista statistico ($P < 0,01$).

Anche in questo caso sono stati riprodotti i calcoli distinguendo tra affetti in terapia con idebenone e affetti non trattati. I grafici in figura 8 riassumono quanto osservato.

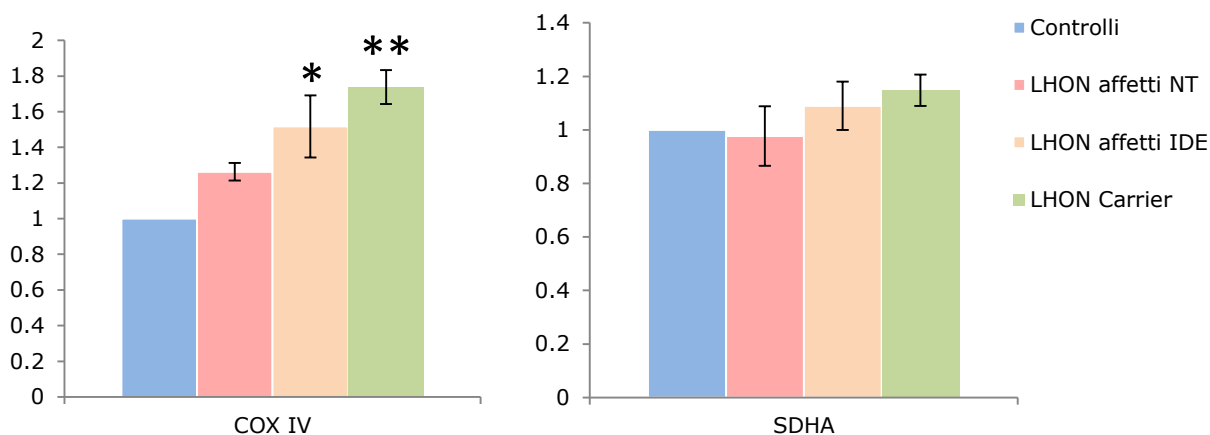


Figura 8 – Livelli proteici di COX IV: distinzione tra affetti trattati e non trattati. (A) Il grafico mostra media ed errore standard per ogni categoria (controlli, affetti trattati, affetti non trattati, carrier); i dati di ogni categoria sono stati rapportati ai controlli. I doppi asterischi (**) indicano un livello di significatività pari a $P < 0,01$, mentre l'asterisco singolo (*) indica un livello di significatività pari a $P < 0,05$; i livelli di significatività sono stati determinati con il test di Dunnett. (B) Nel grafico sono riportati media ed errore standard per ogni categoria (controlli, affetti trattati, affetti non trattati, carrier). Tutti i dati sono stati normalizzati sui controlli.

Anche nei grafici in figura 8 si conferma l'andamento già osservato nei grafici precedenti. In particolare, se si osserva COX IV, la terapia con idebenone pare aumentare in modo statisticamente significativo la massa mitocondriale rispetto a quanto osservato nei pazienti non trattati.

I dati ottenuti dalla quantificazione della massa mitocondriale rispecchiano i risultati pubblicati in *Giordano et al., 2014*. È importante ricordare che le proteine utilizzate nei Western Blotting non sono strettamente correlate alla mitobiogenesi, in quanto non sono fattori implicati nella regolazione di tale processo; i livelli cellulari di SDHA e COX IV sono però indicativi della quantità di mitocondri nella cellula, e sono perciò indirettamente associati all'efficienza della biogenesi mitocondriale. Un risultato interessante è rappresentato dalla correlazione che è stata individuata tra la terapia con idebenone e l'aumento di massa mitocondriale (figura 8): l'influenza di questo trattamento sull'omeostasi mitocondriale potrebbe dunque essere uno dei meccanismi farmacologici con cui l'idebenone esplica la sua azione terapeutica, ancora oggetto di studi.

Conclusioni

I meccanismi patogenetici alla base della Neuropatia Ottica Ereditaria di Leber sono costituiti essenzialmente da difetti biochimici a livello della catena respiratoria, in particolare nella produzione di ATP mediata dal complesso I, nonché da un aumento dello stress ossidativo e disfunzioni nelle vie di signaling proprie dell'apoptosi. Le mutazioni LHON sembrano però avere un ruolo anche nell'ambito del turnover mitocondriale: un incremento nell'eliminazione dei mitocondri tramite i processi di autofagia e mitofagia, più evidente negli affetti rispetto ai carrier, si contrappone ad un aumento della biogenesi mitocondriale maggiormente riscontrabile nei carrier, come meccanismo protettivo dai deficit energetici e dunque dai sintomi della malattia.

In questo studio è stata caratterizzata l'espressione proteica di alcuni marker dell'autofagia (p62 e LC3) in cellule del sangue periferico estratte da pazienti LHON affetti e carrier, e confrontata con individui di controllo. Per completezza, sono stati quantificati anche i livelli di due proteine della membrana interna mitocondriale (COX IV e SDHA), al fine di esaminare la massa mitocondriale delle cellule e confermare quanto pubblicato in *Giordano et al., 2014*.

Per quanto riguarda l'analisi dei livelli di autofagia, è stata riscontrata una tendenza all'aumento del flusso autofagico in individui affetti e carrier, compatibile solo in parte con quanto atteso. Dalla quantificazione della proteina LC3 si evince infatti un debole incremento dell'autofagia simile in entrambe le categorie rispetto ai controlli, mentre, sulla base di dati preliminari ottenuti *in vitro* in fibroblasti LHON, era previsto nei carrier un aumento meno consistente. Allo stesso modo, la terapia con idebenone non sembra avere un ruolo nella riduzione dell'autofagia, al contrario di quanto atteso. Questi risultati potrebbero però non essere risolutivi, per una serie di motivazioni: in primo luogo, l'utilizzo di LC3 come marker autofagico presenta numerose limitazioni, come la dipendenza della sua produzione e processazione dal contesto tissutale delle cellule (*Mizushima et al., 2004*) e la forte variabilità tra individui. Inoltre LC3-I è molto sensibile ai processi di congelamento/scongelo, nonché alla degradazione in buffer contenenti SDS; LC3-II tende poi ad associarsi anche a membrane alternative a quelle autofagosomali, rendendo la correlazione tra LC3-II e il numero di autofagosomi non sempre immediata (*Hanson et al., 2010*). Un ultimo inconveniente che rende complessa la corretta interpretazione dei risultati sta nelle caratteristiche proprie delle cellule esaminate, che non solo potrebbero non essere interessate da eventuali alterazioni dell'autofagia indotte dalle mutazioni LHON, ma crescendo in sospensione sono anche sottoposte allo stress dovuto alle numerose centrifugazioni previste dalla metodica di isolamento, che possono favorire il flusso autofagico (*King et al., 2011*). Per quanto riguarda l'osservazione di p62, questa ha però fornito risultati più conformi con l'ipotesi iniziale, sebbene anche l'espressione di questa proteina sia soggetta ad elevata variabilità ed influenzata dallo stile di vita. Ad esempio

l'esercizio fisico, soprattutto in un contesto di carenza di nutrienti, porta sia ad un incremento dell'autofagia che ad un aumento nell'espressione di p62, impedendo la rilevazione di una significativa diminuzione della proteina e dunque ostacolando la corretta interpretazione dei risultati (Jamart *et al.*, 2013; Sanchez *et al.*, 2014). Per questo potrà essere utile indagare ulteriormente l'espressione di p62 monitorando parallelamente anche i livelli cellulari del mRNA corrispondente. Inoltre, p62 è anche un substrato di CASP6 e CASP8, proteine implicate nei processi di morte cellulare (Norman *et al.*, 2010): sarà dunque indicato negli studi *in vitro* futuri trattare le cellule con inibitori delle caspasi, prima di concludere che la riduzione di p62 sia effettivamente indice di un incremento dell'autofagia. Sarà poi necessario proseguire la campionatura al fine di aumentare gli individui analizzati e ridurre pertanto la variabilità riscontrata sia nel caso di p62 che di LC3. Infine, per quanto riguarda le analisi svolte su COX IV e SDHA, è stato effettivamente osservato un aumento di massa mitocondriale nelle cellule degli individui LHON, specialmente i carrier, nonché un significativo effetto positivo dell'idebenone sulla quantità di mitocondri cellulari nei pazienti affetti. Questo dato permette di affermare che la tendenza all'incremento di autofagia riscontrata negli individui LHON, si inserisce, nel caso dei carrier, in un contesto cellulare caratterizzato da una notevole massa mitocondriale; quest'ultima deriva probabilmente da un'aumentata mitobiogenesi, che funziona da meccanismo protettivo come proposto in Giordano *et al.*, 2014.

Bibliografia

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*. 2005; 70:200-214.

Baracca A, Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baruzzi A, Schapira AH, Martinuzzi A, Carelli V. Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in Leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch Neurol*. 2005; 62(5):730-6.

Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, et al. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69:1005-1075.

Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*. 2003; 278(51):50961-50969.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254.

Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76:1967-1971.

Bu XD, Rotter JL. X chromosome-linked and mitochondrial gene control of Leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on X-chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:8198-8202.

Carelli V, Achilli A, Valentino ML, Rengo C, Semino O, Pala M, Olivieri A et al. Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. 2006; 78:564-574.

Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res*. 2004; 23:53-89.

Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Rizzo G, Carbonelli M et al. Idebenone treatment in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011; 134:e188.

Carelli V. Leber's hereditary optic neuropathy. In: Schapira AHV, DiMauro S, editors. *Mitochondrial Disorders in Neurology*. 2nd edition. Butterworth-Heinemann; Burlington, Mass. 2002;115-142.

Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol*. 1991; 7:453-478.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000; 10:369-377.

DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med*. 2005; 37:222-232.

DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci*. 2008; 31:91-123.

Fernández-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*. 2003; 88:41-56.

Floreani M, Napoli E, Martinuzzi A, et al. Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS J.* 2005; 272:1124-35.

Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:319-324.

Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014; 505(7483):335-43.

Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Blik AM, Spelbrink JN. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell.* 2003; 14:1583-1596.

Ghelli A, Zanna C, Porcelli AM, et al. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *J Biol Chem.* 2003; 278:4145-4150.

Giordano C, Iommartini L, Giordano L, Maresca A, Pisano A, Valentino ML, Caporali L et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain.* 2014; 137:335-353.

Giordano L, Deceglie S, d'Adamo P, Valentino ML, La Morgia C, Fracasso F, Roberti M, Cappellari M, Petrosillo G, Ciaravolo S, Parente D, Giordano C, Maresca A et al. Cigarette toxicity triggers Leber's hereditary optic neuropathy by affecting mtDNA copy number, oxidative phosphorylation and ROS detoxification pathways. *Cell Death Dis.* 2015; in stampa.

Gustaffson CM, Falkenberg M, Larsson NG. Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 2016; 85:9.1-9.28.

Hägerhäll C. Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1320(2):107-141.

Hanson HH, Kang S, Fernández-Monreal M, et al. LC3-dependent intracellular membrane tubules induced by γ -protocadherins A3 and B2. A role for intraluminal interactions. *J Biol Chem.* 2010; 285(27):20982-20992.

Heggeness MH, Simon M, Singer SJ. Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75:3863-3866.

Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell.* 2000; 100(5):515-524.

Hutchison CA III, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature.* 1974; 251(5475):536-8.

Jamart C, Naslain D, Gilson H, Francaux M. Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(8):E964-E974.

Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Gen.* 1996; 14:146-151.

Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* 2015; 282:4672-4678.

- King JS, Veltman DM, Insall RH. The induction of autophagy by mechanical stress. *Autophagy*. 2011; 7(12):1490-1499.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016; 12(1):1-222.
- Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, Rouleau J et al. A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011; 134:2677-2686.
- Kukat C, Larsson NG. mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. *Trends Cell Biol*. 2013; 23:457-463.
- Lackner LL. Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biology*. 2014; 27:12-35.
- Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuven Res*. 2005; 8(1):3-5.
- Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1366:53-67.
- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci*. 2004; 117:2653-2662.
- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004; 463-477.
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohè L. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*. 1974; 42:68-72.
- Maes H, Agostinis P. Autophagy and mitophagy interplay in melanoma progression. *Mitochondrion*. 2014; 19:58-68.
- Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*. 2003; 72:333-339.
- Marambio P, Toro B, Sanhueza C, Troncoso R, et al. Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2010; 1802:509-518.
- Maresca A, la Morgia C, Caporali L, Valentino MV, Carelli V. The optic nerve: A "mito-window" on mitochondrial neurodegeneration. *Mol and Cell Neurosci*. 2012; 55:72-66.
- Margulis L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*. 1975; 29:21-38.
- Mashima Y, Kigasawa K, Wakakura M, Oguchi Y. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *J. Neuro-ophthalmol*. 2000; 20:166-170.
- Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000; 407:796-801.

- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961; 191:144-148.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 2004; 15(3):1101-1111.
- Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1757(9-10): 1179-1189.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009; 417:1-13.
- Norman JM, Cohen GM, Bampton ET. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy*. 2010; 6:1042-56.
- O'Brien. Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease. *Gene*. 2002; 286:73-79.
- Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging *Physiol Rev*. 1997; 77:425-464.
- Patergnani S, Pinton P. Mitophagy and mitochondrial balance. *Methods Mol Biol* 2015; 1241:181-94.
- Perkins GA, Renken CW, Frey TG, Ellisman MH. Membrane architecture of mitochondria in neurons of the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2001; 66:857-865.
- Rustin P, Rötig A. Inborn errors of complex II--unusual human mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1553(1-2):117-122.
- Sanchez AM, Bernardi H, Py G, Candau RB. Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014; 307:R956-R969.
- Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. 1999; 283:1488-1493.
- Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*. 2008; 88:611-638.
- Schultz BE, Chan SI. Structures and Proton-Pumping Strategies of Mitochondrial Respiratory Enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2001; 30:23-65.
- Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(49):19500-19505.
- Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, McManus M, Crimi M, et al. Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell*. 2012; 151: 333-343.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 1999; 402:371-372.

- Tan CC, Yu JT, Tan MS, Jiang T, Zhu XC, Tan L. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol Aging*. 2013, 35: 941-957.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9:231-24.
- Thukral L, Sengupta D, Ramkumar A, et al. The Molecular Mechanism Underlying Recruitment and Insertion of Lipid-Anchored LC3 Protein into Membranes. *Biophys J*. 2015; 109:2067-78.
- Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2010; 1797:113-128.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Shurr TG et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988; 242:1427-1430.
- Wikström M. Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone. *FEBS Lett*. 1984 169:300-304.
- Young MJ, Copeland WC. Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2016; 38:52-62.
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF, Mitochondrial optic neuropathies-disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2011; 30:81-114.