Come si organizza la Làmina nucleare e a cosa provvede: proteine coinvolte in malattie genetiche di Làmina

Stoian Larisa Oana, ITIS Belluzzi Bologna
Francesca Petrillo, Liceo Righi Bologna
Istituto di Genetica Molecolare/CNR, Unità di Bologna
Programma SPERIMESTATE 2015

LA LÀMINA NUCLEARE

La LÀMINA NUCLEARE È UNA RETE DI PROTEINE: LAMÌNE A,B,C

Si trova sul foglietto interno dell'involucro nucleare, che è formato da una doppia membrana, foglietto interno ed esterno, congiunti in corrispondenza dei pori nucleari.

Le **LAMÌNE A e C** sono prodotte dallo stesso pre-mRNA, tagliato nella lamìna C, in regione C-terminale, di 133 residui amminoacidici.

Le **LAMÌNE tipo B, B1 e B2**, sono codificate da altri mRNA.

Le lamine A , B1, B2, vengono modificate dopo la loro traduzione in proteine, in comune hanno l'aggiunta di un gruppo isoprenilico,acido grasso, idrofobico, nella coda C-terminale, tagliato nella Lamina A, da una endoproteasi.

Le LAMÌNE formano dimeri e la polimerizzazione di questi dimeri genera i FILAMENTI DELLA LÀMINA.
Inserite nella membrana nucleare interna vi sono proteine integrali, quali il recettore per la lamìna B(LBR) che ha domìni transmembrana, l'emerina che ha un domìnio transmembrana, proteine associate alla làmina A (LAP1) e altre proteine che regolano il sistema citoscheletrico del citoplasma.
INTERAZIONI TRA LE PROTEINE DI LÀMINA E QUELLE DI MEMBRANA NUCLEARE fanno sì che la LÀMINA NUCLEARE sia PONTE DI COMUNICAZIONE PER SEGNALI TRA NUCLEO, inteso come DNA, proteine istoniche e fattori di trascrizione, **E CITOPLASMA**.

MALATTIE GENETICHE da mutazione della LAMINA A

-Specifiche mutazioni, oltre 200, presenti sul gene della Lamina A, danno patologie di tipo differente, che possono essere tissutali (a) e sistemiche (b). Ne citiamo una per tipo:

-a.**DISTROFIA MUSCOLARE EMERY-DREIFUSS, EDMD**

-b **Progeria di Hutchinson-Gilford, HGPS**

Fanno parte di malattie dette **LAMINOPATIE**

In HGPS, a causa della mutazione presente nel gene, il taglio da parte di una endoproteasi sui residui amminoacidici che contengono il gruppo isoprenile, ac grasso, non viene effettuato. **La LAMINA A rimane ISOPRENILATA, e la sua funzione è compromessa**.

Nella distrofia muscolare EDMD, la Lamìna A mutata porta distruzione del tessuto muscolare e cardiomiopatia.

Mutazioni di proteine della membrana connettivale che avvolge le fibre muscolari, danno anch'esse Distrofie muscolari con distruzione di tessuto muscolare: **la distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e di Becker (BMD)** causate da mutazioni specifiche sul gene della distrofina.

Nella DMD e in distrofie da modelli animali si riscontra inoltre STRESS OSSIDATIVO NELLE CELLULE MUSCOLARI.

Le lamìne in generale hanno funzione di sostegno per l'involucro nucleare e contribuiscono alla sua stabilità.

Alla instabilità dell'involucro, determinata da difetti (mutazioni) di proteine di Làmina, molti ricercatori attribuiscono la causa di distruzione del tessuto muscolare, dovuta a scarsa resistenza alle sollecitazioni meccaniche.

In questo studio ci proponiamo di capire se lo Stress ossidativo nelle cellule muscolari ha effetti sulla composizione della Làmina nucleare

Che effetti produce lo Stress ossidativo sulle cellule muscolari e sulle LAMÌNE A e B1?

Lo stress ossidativo è la condizione di prevalenza di danno cellulare ad opera dei radicali liberi

Per introduzione riportiamo alcuni accenni sui Radicali liberi, sui ROS, sulla formazione dei ROS, la loro azione, e la funzione degli enzimi antiossidanti.

I RADICALI LIBERI

O_2^-, $HO_2\bullet$, sono molecole estremamente reattive, le prime due sono radicali liberi poichè hanno un elettrone spaiato e tendono a strapparne un altro da una molecola prossimale per raggiungere la stabilità. H_2O_2 non è un radicale libero, ma produce •OH radicale

Ne sono produttori:

- Radiazioni ionizzanti
- Raggi UV
- Farmaci
- Eccesso di ossigeno
- Aumento di Temperatura
- Produzione di ATP
- Inquinamento
- Globuli bianchi

I ROS

I ROS sono i radicali liberi più diffusi. Molti di essi sono naturalmente **prodotti nei mitocondri nella conversione di energia chimica in ATP**, ma si formano anche per effetto di agenti esterni IR, UV, esposizione al caldo. Sono compresi nei ROS :

- **Anione superossido ($\bullet O_2^-$)**catena respiratoria
- **Radicale Idrossile (•OH)** leucociti(NADPH-ossidasi), idrolisi H2O, H2O2 (perossidasi)
- **Monossido di azoto (NO-•)** da NO sintetasi
- **Anione perossinitrito (ONOO-•)** da NO-•+ O_2^-
- **Radicale idroperossido ($\bullet HO_2$) ,** da $\bullet O_2^-$ + H+

LA CONVERSIONE DELL'ENERGIA CHIMICA IN ATP

- Una forte quantità di energia è richiesta per il lavoro muscolare, perciò il muscolo converte grande quantità di energia chimica degli alimenti, in energia utilizzabile sotto forma di ATP.
- Il processo genera elettroni , che sono ceduti in coppia, da NADH e FADH2 alla catena respiratoria dei mitocondri, costituita da una serie di enzimi trasportatori, finchè essi arrivano all' O_2, ossigeno molecolare, ACCETTORE finale, per formare H_2O e liberare Energia utilizzata per sintetizzare ATP.
- REAZIONE: O_2- - + 2H+ → H2O + Energia
- Energia → ATP

LA FORMAZIONE DEI ROS NEI MITOCONDRI DEL MUSCOLO

Se un solo elettrone viene ceduto ad una molecola di O_2 , non una coppia di elettroni, **si forma un anione superossido**, **O_2^- , radicale libero dannoso**, che viene neutralizzato da enzimi antiossidanti. **Se gli enzimi sono insufficienti**, **più O_2^- rimangono nella cellula, O_2^- può essere protonato da H+ , e si forma il radicale idroperossido ($HO_2\bullet$), al quale si unisce un altro O_2^-** .
REAZIONE: **$2HO_2\bullet + O_2^- \rightarrow O_2 + H_2O_2$**
H_2O_2 è inoltre fortemente instabile
Nel tessuto muscolare scheletrico, sono infatti i mitocondri la pricipale fonte di ROS.

GLI ENZIMI ANTIOSSIDANTI CHE LI NEUTRALIZZANO:

Superossido dismutasi : $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Catalasi : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Glutatione perossidasi: $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ e $2OH + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$

Sono enzimi attivati dai radicali liberi, ma se non sufficientemente attivi, i radicali liberi produrranno:

- Ossidazione di fosfolipidi e proteine di membrana

-Mutazioni del DNA , principalmente ossidazione a 8-idrossideossiguanosina (8-OHdG) da deossiguanosina

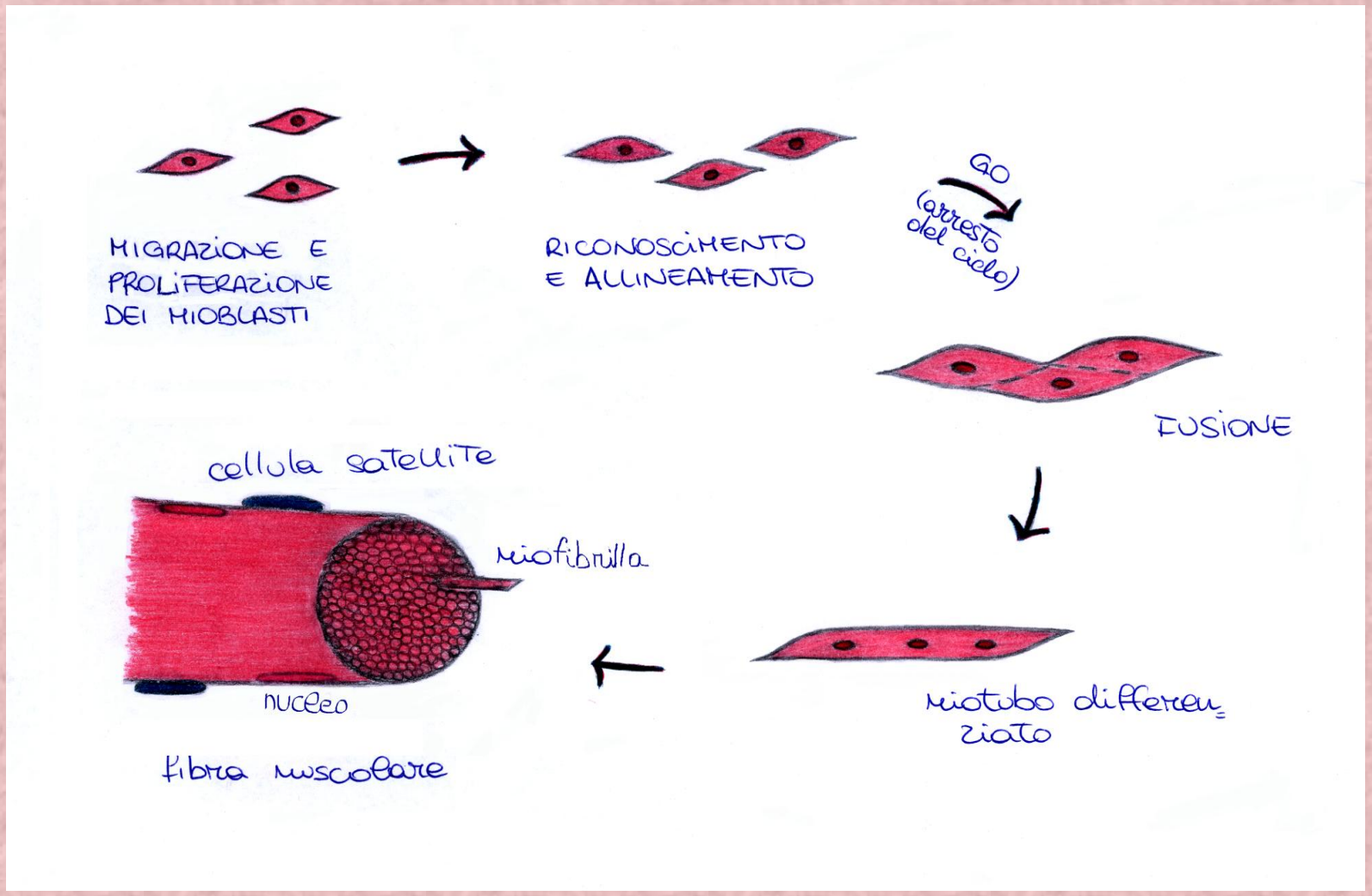
- alterazione degli enzimi mitocondriali della catena respiratoria

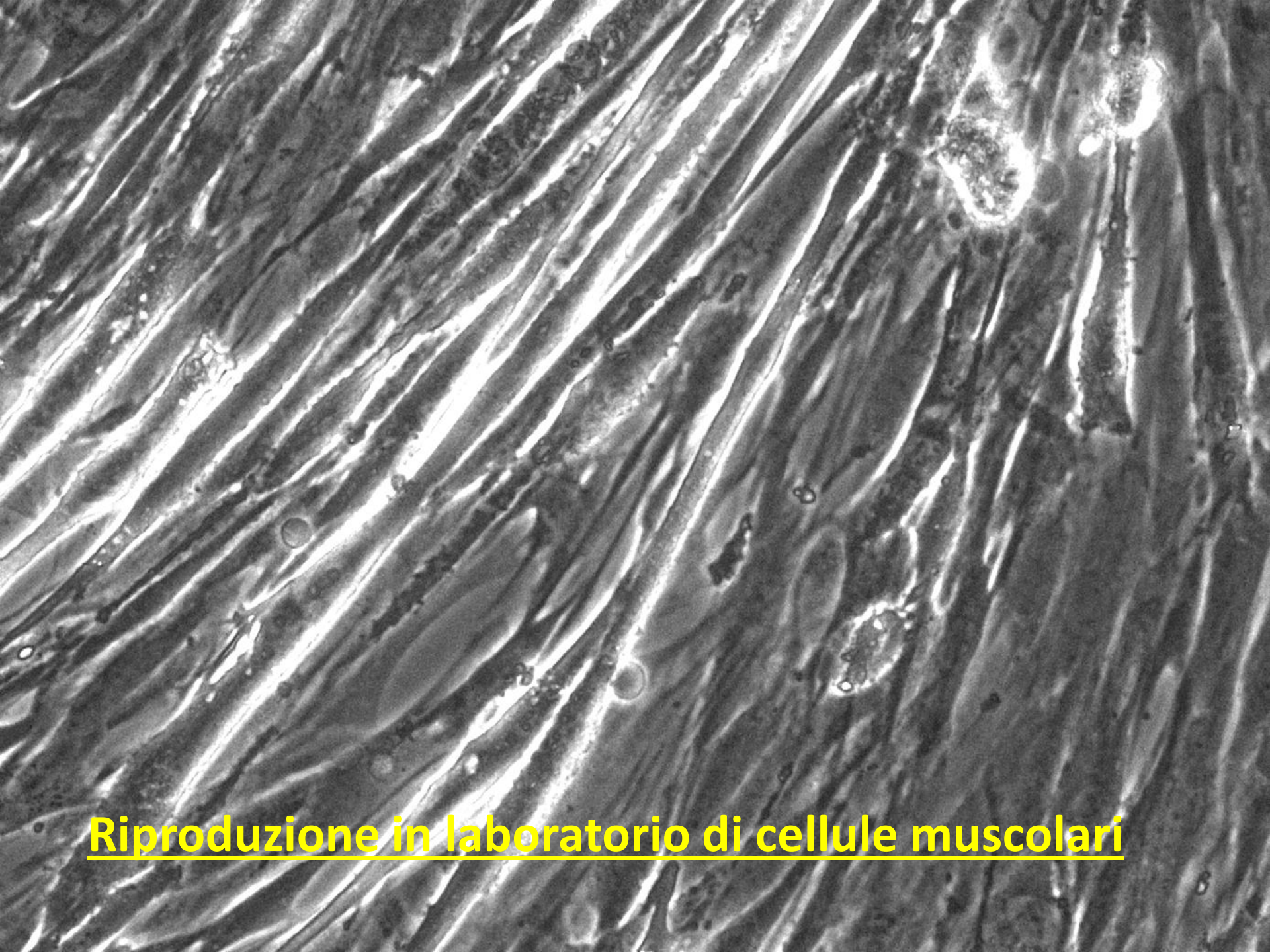
Le membrane mitocondriali saranno attaccate :
-nella cardiolipina che lega la citocromo ossidasi c, trasportatore di elettroni verso l'O_2;
-nelle proteine antiossidanti come superossido dismutasi;
-nel DNA mitocondriale che non ha forti enzimi riparatori.
I mitocondri delle cellule muscolari perderanno:

- la capacità di produrre ATP
- la capacità di tamponare i ROS con gli enzimi antiossidanti.

IL TESSUTO MUSCOLARE PERDE FORZA E CAPACITÀ CONTRATTILE, PERDE MASSA E VA INCONTRO AD ATROFIA.
Tale condizione è comunemente legata all'età.

Come si forma una fibra muscolare





Riproduzione in laboratorio di cellule muscolari

Le Cellule satelliti

Sono Cellule Staminali Adulte del muscolo.
Cellule muscolari quiescenti che in seguito a danno o lesione della fibra si attivano, proliferano, migrano verso la fibra danneggiata, rigenerano nuove cellule.

Nel muscolo in stress ossidativo, dopo il danneggiamento delle cellule muscolari, le cellule satelliti si attivano per sostituire le cellule danneggiate. Questo processo riparativo non è così efficiente nell'anziano .

La Risposta adattativa del muscolo

L'attività muscolare aumenta la produzione dei ROS, che hanno la capacità di stimolare l'attività degli enzimi antiossidanti in grado di neutralizzarli, sicchè I ROS vengono per lo più resi innocui. **La produzione di ROS genera una risposta adattativa positiva che permette alla cellula muscolare di sopportare carichi maggiori di radicali liberi senza danno cellulare**. Un sistema di questo tipo crea condizioni migliorative per il muscolo il quale può sopportare successive attività muscolari più intense, dispensando energia senza danno

Per studiare l'effetto dello stress ossidativo nel muscolo, abbiamo applicato alle cellule C2C12, una dose di perossido di idrogeno, H_2O_2 , inducendo in vitro questa condizione.

Le C2C12 sono cellule muscolari di origine murina con caratteristiche di staminalità, simili alle cellule satelliti.

Seminate in fiasche, fatte proliferare, messe poi in terreno povero di siero, differenziano in miotubi, cellule muscolari differenziate.

Applicando H_2O_2 al mezzo di coltura, H_2O_2 attraversa le membrane cellulari, entra nella cellula, e produce formazione e accumulo di ROS.

Noi abbiamo esaminato se i ROS prodotti sono in grado di produrre danno al DNA, utilizzando una reazione di immunofluorescenza indiretta che rivela i punti di rottura del DNA, dopo un tempo di recupero di 48ore, realizzato con terrreno senza H_2O_2 .

La reazione è di tipo Antigene-Anticorpo, dove l'ANTIGENE (Ag) è la proteina marker presente dove il DNA è rotto, GAMMA H2AX FOSFORILATO, che si lega all'ANTICORPO(Ab) ANTI-G H2AX FOSFORILATO, Ab primario commerciale. Un Ab secondario coniugato a trietanolrodamina isotiocianato, TRITC, contro la specie ospite da cui è stato ottenuto l'Ab primario, in questo caso rabbit, ANTI-RABBIT TRITC, sarà incubato e si legherà all' Ab primario anti-g H2AX fosforilato

Antigeni e Anticorpi

ANTIGENE (Ag) : molecola riconosciuta come estranea perché lega anticorpi del sistema immunitario. Può essere un polisaccaride, una proteina, un acido nucleico.

EPITOPO è la parte di Ag che lega l'Anticorpo.

CROSS-REAZIONE è una FALSA REAZIONE di legame determinata dal riconoscimento di epitopi omologhi su antigeni diversi.

ANTICORPO(Ab):glicoproteina solubile, prodotta dai linfociti in seguito all'esposizione dell'organismo ad un corpo estraneo, appartiene alla classe delle immunoglobuline Puo essere MONOCLONALE se gli Ab sono uguali tra loro e DIRETTI VERSO UN SOLO EPITOPO dell'antigene e POLICLONALE se gli Ab sono diversi tra loro e DIRETTI VERSO PIÙ EPITOPI differenti dello stesso Ag.

Come si applica una reazione di immunofluorescenza

La fissazione del materiale biologico impedisce la degradazione dell'antigene, e lo mantiene nella posizione originale. Se si adottano fissativi a base di aldeidi, l'antigene non è accessibile all'anticorpo primario, ma è bloccato da legami con altre molecole, quindi bisogna aprire i legami per renderlo accessibile. Se si usa metanolo, il fissativo apre i legami e permeabilizza allo stesso tempo. Il successo della reazione Antigene-Anticorpo dipende dall'Anticorpo primario, in quanto SENSIBILE, cioè capace di riconoscere quantità minime di antigene, e SPECIFICO ovvero reagisce solo con l'epitopo dell'Antigene da riconoscere

Prelievo di materiale biologico

-Fissazione

- Lavaggi in tampone fosfato

-permeabilizzazione in triton (rottura legami ed esposizione siti antigenici)

- Blocco siti aspecifici con albumina in tampone fosfato

- incubazione con Ab primario

- Lavaggi in tampone fosfato

-Incubazione con Ab secondario coniugato ad un fluorocromo, contro l'animale da cui si è ottenuto l'anticorpo primario

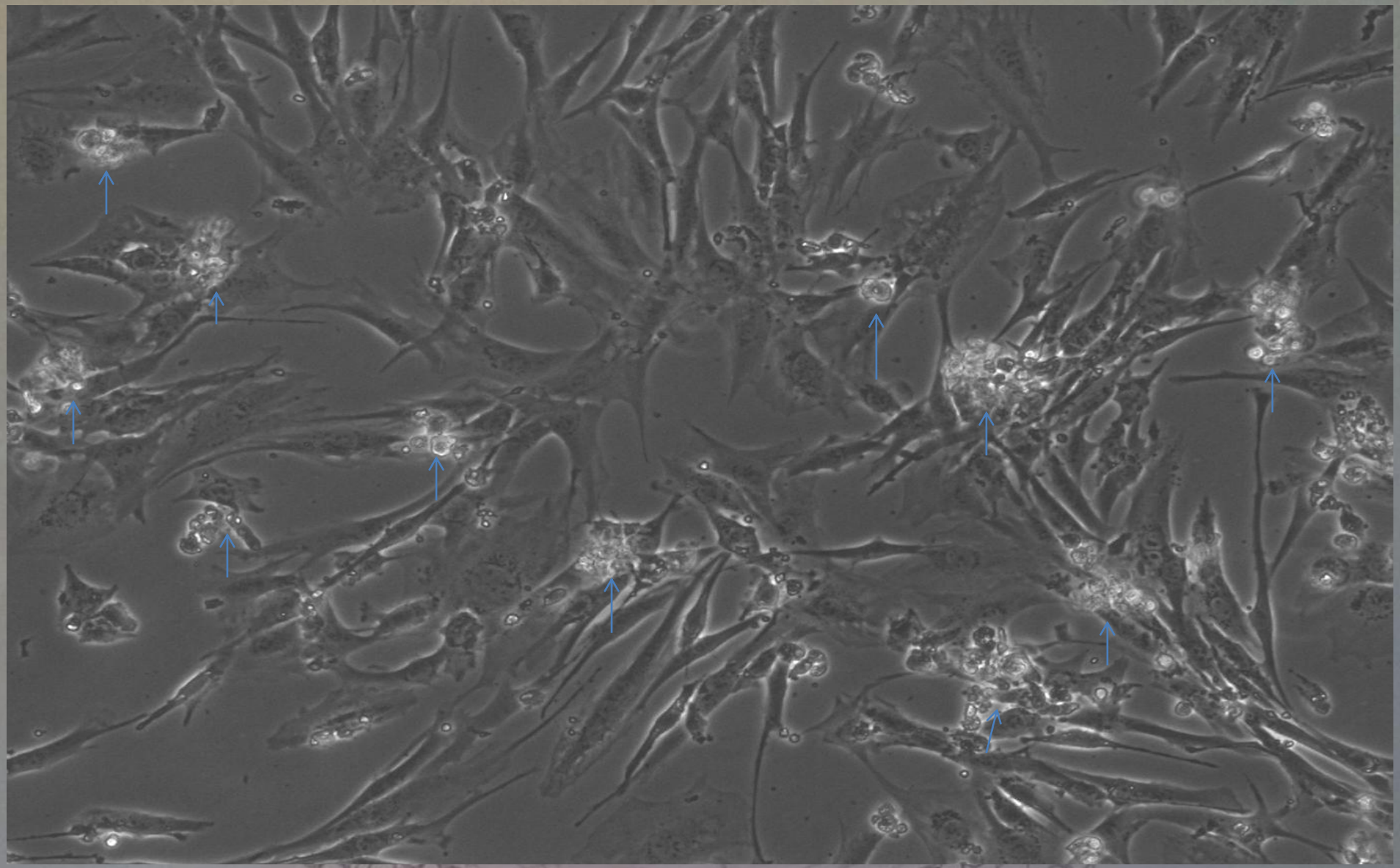
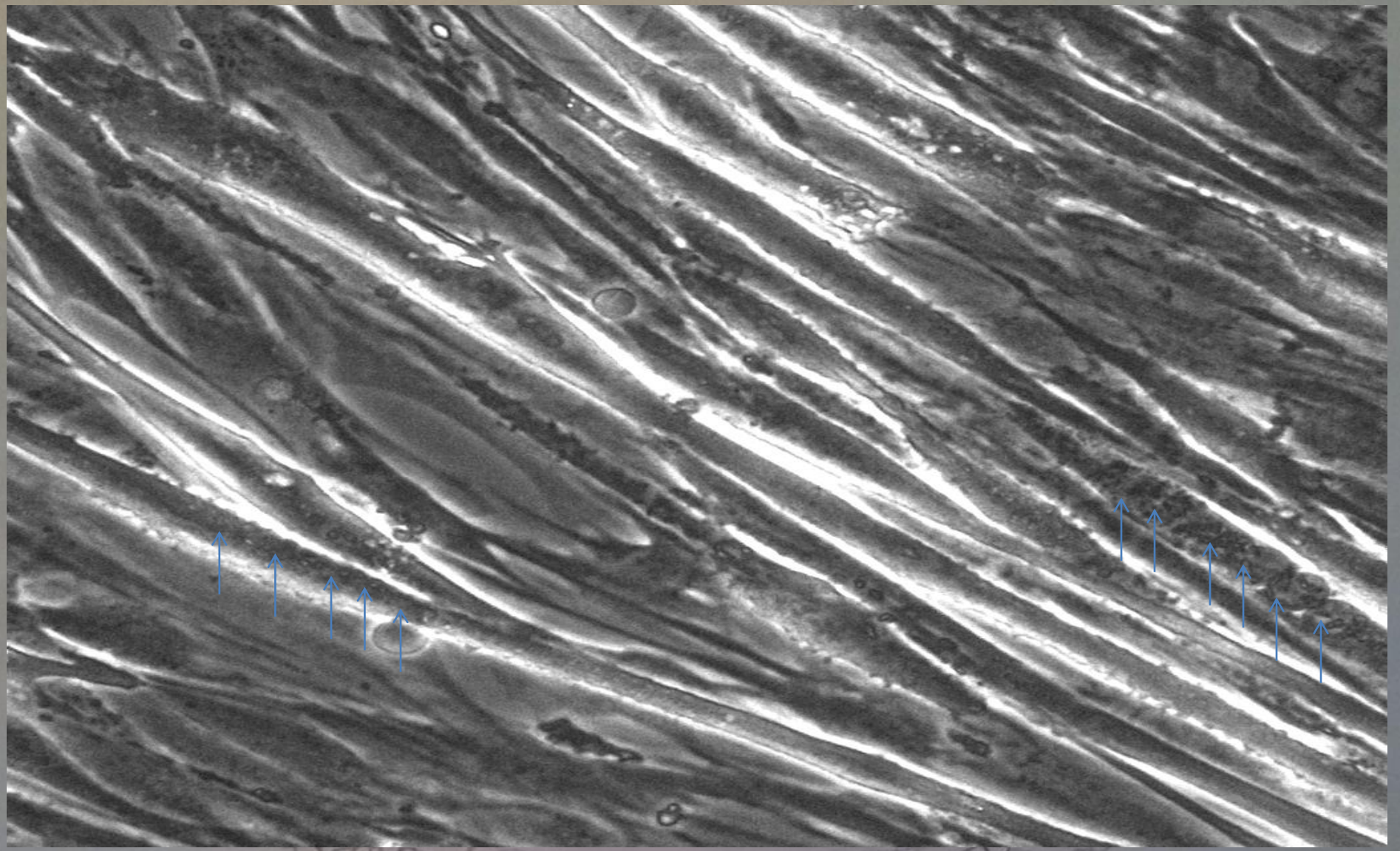


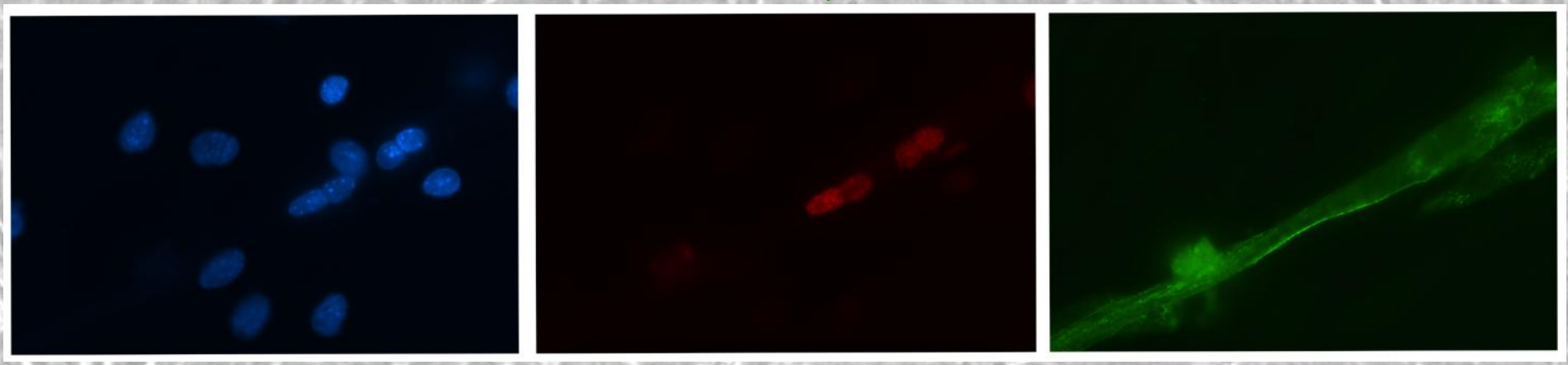
FOTO in contrasto di fase. Cellule C2C12 proliferanti a cui è stata somministrata, nel terreno di coltura, una dose di H_2O_2 200 microM per 150 min. Sono evidenti cellule APOPTOTICHE in distacco



Le cellule confluenti sono meno sensibili. Una dose di 50 microM di H_2O_2 è stata applicata alle cellule in subconfluenza, e successive due dosi applicate a giorni alterni, in terreno povero di siero. Sono evidenti i MIOTUBI multinucleati ottenuti dalla fusione di singoli mioblasti

Al 6° giorno di coltura applichiamo una doppia reazione di immunofluorescenza con ANTI-CAVEOLINA E ANTI- GAMMA H2AX FOSFORILATO.

FOTO di MIOTUBO, con reazione positiva per CAVEOLINA, proteina marker di differenziamento muscolare,e GAMMA H2AX FOSFORILATO.



DAPI colorante del DNA gamma H2AX fosforilato caveolina

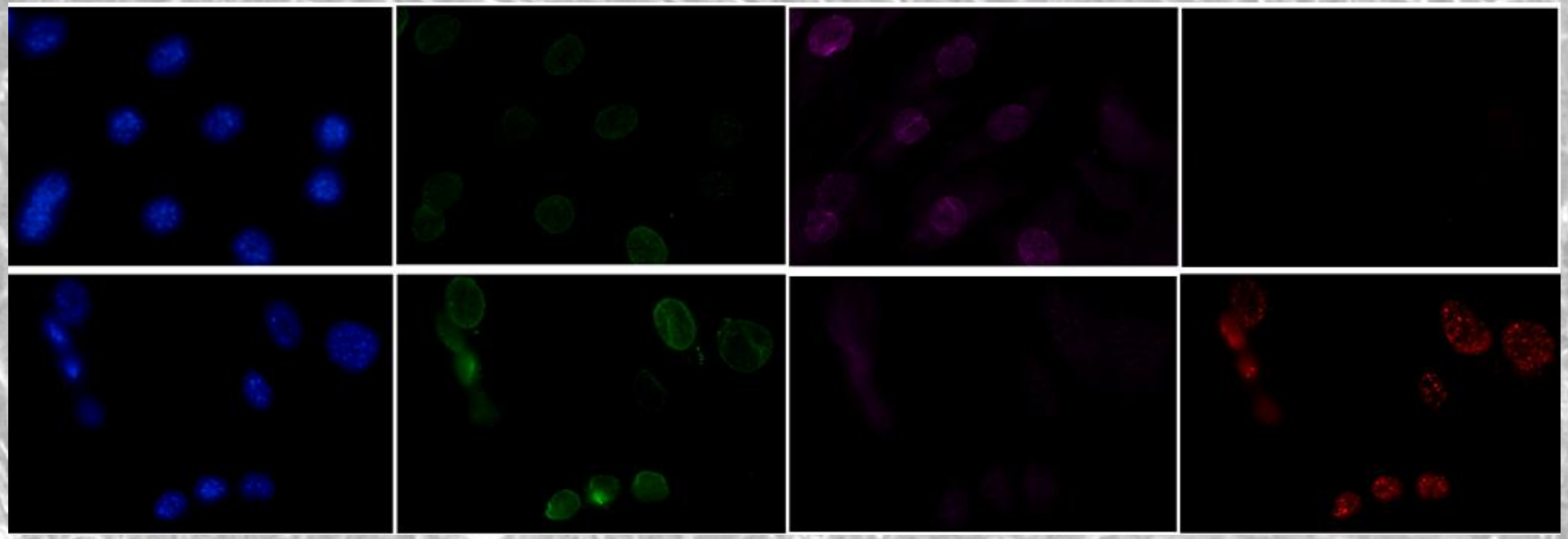
CELLULE C2C12 DIFFERENZIATE IN MIOTUBO E POSITIVE PER DANNO AL DNA, ovvero QUESTE CELLULE MUSCOLARI DIFFERENZIANO ANCHE IN PRESENZA DI DANNO AL DNA.

Per vedere l'effetto dello stress ossidativo sulle proteine di Làmina, applichiamo a un nuovo campione di cellule C2C12 in coltura, tre dosi di 50 microM H_2O_2, diluite nel terreno di coltura. Dopo 48 ore di recupero con terreno nuovo, senza H_2O_2, applichiamo una tripla reazione di immunofluorescenza con gli anticorpi anti-lamìna A, anti-lamìna B1, e anti- gamma H2AX fosforilato.

Possiamo così verificare contemporaneamente l'effetto dei ROS, come danno al DNA e come effetto sulle proteine di làmina, A e B1.

C2C12 controllo non trattate

C2C12 trattate con 50 microM H_2O_2



DAPI corante del DNA LAMINA A LAMINA B1 gH2AX FOSFORILATO

Sulla base del numero di spots prodotti per gammaH2AX e intensità di fluorescenza per Lamìna A e Lamìna B1 nei nuclei delle cellule muscolari, osserviamo le variazioni della quantità di proteine in condizioni di stress ossidativo.

CONCLUSIONI SULLA REAZIONE:

- La Lamina A è complessivamente più espressa nelle cellule muscolari in stress ossidativo
- La lamina B1 diminuisce nelle cellule in stress ossidativo

CONCLUSIONI: le proteine di lamina nucleare A e B1 subiscono variazioni della loro quantità normalmente espressa, rimane da verificare il significato di queste variazioni rispetto al normale, nell'ipotesi di una loro influenza su un cambiamento della stabilità nucleare importante in un tessuto muscolare sottoposto a continui stress meccanici.