



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**Interazioni mitocondrio-reticolo endoplasmatico nella sclerosi laterale
amiotrofica**

Relatore

Prof.ssa Laura Paola Ferilde TAPPELLA

Candidato

Alice PRANDINA

SESSIONE STRAORDINARIA A.A 2024/2025

A mia nonna Daria,

*che mi ha trasmesso il valore della forza
anche quando la memoria si affievolisce e il corpo diventa fragile.*

*L'Alzheimer ti ha portata via poco alla volta,
ma non è riuscito a cancellare l'affetto
né l'impronta profonda che hai lasciato nella mia vita.*

*Questa tesi, sebbene dedicata alla SLA,
nasce dal desiderio di comprendere,
studiare e cercare risposte per le patologie neurodegenerative che, lentamente,
privano le persone della propria identità,
nella speranza che un giorno si possa trovare una cura.*

So che saresti stata orgogliosa di me.

Indice

Abbreviazioni.....	1
Introduzione.....	5
Capitolo I	7
1.1 La sclerosi laterale amiotrofica	7
1.2 Il motoneurone, l'unità di regolazione del movimento	9
1.3 Eziopatogenesi della SLA: forma familiare e forma sporadica	14
1.4 La Demenza Frontotemporale nello spettro SLA–FTD	18
1.5 Meccanismi di patogenesi alterati	20
Capitolo II	23
2.1 Mitocondrio e reticolo endoplasmatico: basi biologiche per lo studio dei MERCs	23
2.2 La scoperta dei MERCs	26
2.3 Funzioni dei MERCs	28
2.4 Componenti proteiche dei MERCs	34
2.5 Panoramica delle metodologie di studio dei MERCs	40
Capitolo III	43
3.1 Alterazioni dei MERCs nelle malattie neurodegenerative	43
3.2 Evidenze sperimentali del coinvolgimento dei MERCs nella SLA	44
3.2.1 Modelli cellulari di SLA e alterazioni dei MERCs	45
3.2.2 Modelli animali di SLA e alterazioni dei MERCs	48
3.3 Meccanismi molecolari alla base della disfunzione dei MERCs nella SLA ..	52
Conclusioni e prospettive future	59
Bibliografia.....	65

Ringraziamenti	75
----------------------	----

Abbreviazioni

ATF6 fattore di trascrizione attivante 6

ATG14L regolatore chiave correlato all'autofagia

ATP Adenosina Trifosfato

Bap31 B-cell receptor associated protein 31

Bip/GRP78 78 KDa glucose-regulated protein

C9orf72 Chromosome 9 open-reading frame 72

Ca²⁺ ione calcio

DPR dipeptide repeat proteins

EM microscopia elettronica

ER reticolo endoplasmatico

fALS Sclerosi laterale amiotrofica familiare

Fis1 mitochondrial fission protein 1

FTD Demenza frontotemporale

FUS Fused in Sarcoma

GRP75 chaperonica 75 regolata dal glucosio

GSK3 β glycogen synthase kinase-3 β

IMM membrana mitocondriale interna

IMS spazio intermembrana

IP3 inositolo-1,4,5-trifosfato

IP3R recettore per l'inositolo 1,4,5-trifosfato

iPS cellule staminali pluripotenti indotte

IRE1 Inositol-requiring enzyme 1

IRE1 α inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 α

LMN Motoneuroni inferiori

MCU Mitochondrial Calcium Uniporter

MERCs Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Contacts

Mfn1 mitofusina 1

Mfn2 mitofusina 2

MN Motoneurone

mPTP poro di transizione mitocondriale della permeabilità

OMM membrana mitocondriale esterna

PERK protein kinase RNA-like ER kinase

PLA Proximity Ligation Assay

PTPIP51 protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51

REL reticolo endoplasmatico liscio

RER reticolo endoplasmatico rugoso

ROS Reattive dell'ossigeno

sALS Sclerosi laterale amiotrofica sporadica

SG Granuli di stress

SLA (o ALS) Sclerosi Laterale Amiotrofica

SLA-FTD SLA con demenza frontotemporale

SNC Sistema nervoso centrale

SOD1 Superossido Dismutasi 1

SpMN motoneuroni spinali

TARDBP Transactive Response DNA-binding protein

TDP-43 Transactive response DNA binding protein 43

UMN Motoneuroni superiori

UPR unfolded protein response

VAPB vesicle-associated membrane protein-associated protein B

VCP Valosin Containing Protein

VDAC1 canale anionico voltaggio-dipendente 1

α MN neuroni motori alfa

β MN neuroni motori beta

γ MN neuroni motori gamma

Introduzione

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa progressiva caratterizzata da una degenerazione selettiva dei motoneuroni corticali, bulbari e spinali, con interessamento sia del sistema nervoso centrale sia di quello periferico. La perdita di queste cellule altamente specializzate comporta un deterioramento progressivo della funzione motoria volontaria, che si manifesta clinicamente con debolezza e atrofia muscolare, spasticità e crampi, cui si associano, nelle fasi avanzate, disartria, disfagia e compromissione della funzione respiratoria. L'evoluzione clinica è in genere rapidamente progressiva e conduce, nella maggior parte dei pazienti, a esito fatale dopo pochi anni dall'esordio dei sintomi, rendendo la SLA una delle più gravi e invalidanti patologie neurodegenerative dell'età adulta¹. L'eziopatogenesi della SLA è complessa e coinvolge molteplici fattori: alterazioni genetiche, stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, disregolazione dell'omeostasi dello ione calcio, risposte infiammatorie e accumulo di proteine non ripiegate correttamente cooperano nel determinare il danno neuronale. Sebbene siano stati compiuti significativi progressi nella comprensione degli aspetti genetici e molecolari della malattia, i processi responsabili della vulnerabilità selettiva dei motoneuroni risultano ancora solo parzialmente definiti².

Negli ultimi decenni, diverse evidenze sperimentali hanno messo in luce il ruolo centrale dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico nella patogenesi della SLA. In tale contesto, un crescente interesse si è concentrato sui MERCs (Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Contacts), microdomini specializzati di interazione fisica e funzionale che si formano tra i due organelli. Queste strutture coordinano processi cellulari chiave, come il passaggio dello ione calcio, la sintesi dei lipidi, la dinamica dei mitocondri e l'innescamento di specifiche cascate apoptotiche. Le Modificazioni dei MERCs sono state osservate in diverse malattie neurodegenerative, inclusa la SLA, suggerendo un importante contributo alla compromissione della funzione neuronale³.

Alla luce di queste evidenze scientifiche, emerge l'ipotesi che la disorganizzazione dei MERCs non rappresenti un semplice evento secondario nella SLA, ma essi contribuiscono in modo significativo alla fisiopatologia della malattia. La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la formazione, il mantenimento e la funzione di tali siti di contatto potrebbe pertanto offrire nuove chiavi interpretative per spiegare la vulnerabilità dei motoneuroni e identificare potenziali bersagli terapeutici.

Lo scopo del presente lavoro è analizzare, da un punto di vista fisiologico e molecolare, il ruolo dei MERCs nella patogenesi della SLA. In particolare, la tesi si propone di integrare le conoscenze di base sulla biologia dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico con le recenti evidenze sperimentali che documentano le alterazioni dei MERCs in modelli cellulari e animali di SLA. Attraverso una rassegna critica della letteratura, verranno esaminati i principali meccanismi molecolari coinvolti, con particolare attenzione alle conseguenze sulla regolazione dello ione calcio, sul metabolismo energetico, sulla proteostasi e sulla sopravvivenza neuronale.

La seguente tesi è stata realizzata mediante un'analisi critica della letteratura scientifica disponibile, utilizzando la banca dati PubMed (National Library of Medicine). La ricerca bibliografica è stata condotta impiegando termini quali "amyotrophic lateral sclerosis", "mitochondria-endoplasmic reticulum contacts" e "MERCs", selezionando soprattutto articoli rilevanti pubblicati negli ultimi 10-15 anni. L'obiettivo finale è fornire una visione integrata e aggiornata sul ruolo dei MERCs nella SLA, evidenziando le implicazioni biologiche e le potenziali prospettive future in ambito di ricerca e terapia.

Capitolo I

1.1 La sclerosi laterale amiotrofica

La SLA è una patologia neurodegenerativa multisistemica descritta per la prima volta a partire dal XIX secolo definita ai tempi come una debolezza muscolare progressiva accompagnata da atrofia muscolare⁴.

La SLA è comunemente identificata come malattia del motoneurone (MN), in quanto comporta una progressiva perdita dei motoneuroni superiori (UMN) a livello corticale e dei motoneuroni inferiori (LMN) nel midollo spinale e nel bulbo¹; tale degenerazione determina deficit motori progressivi e, in ultima analisi, compromissioni della funzione respiratoria e della qualità della vita dei pazienti.

I sintomi della SLA risultano essere differenti a seconda del distretto colpito. Se l'esordio è bulbare avremo una debolezza nei muscoli facciali, linguali e faringei, producendo disartria e successivamente disfagia. Se al contrario l'esordio è spinale i muscoli coinvolti saranno quelli distali degli arti superiori o inferiori¹. Questo quadro di presentazione riflette la diversa vulnerabilità degli MN nei vari distretti anatomici e sottolinea l'esigenza di una diagnosi precoce e differenziale per orientare la gestione clinica e le scelte terapeutiche sebbene per la diagnosi solitamente trascorre un periodo pari a 10/16 mesi.

Si stima che a livello mondiale la prevalenza sia di 4,42 ogni 100.000 abitanti. Ad essere soprattutto colpite sono le popolazioni delle regioni maggiormente sviluppate; infatti i casi riscontrati sono più elevati in Europa occidentale, mentre i più bassi in Asia meridionale. È stata anche osservata una tendenza temporale con un aumento dell'incidenza di 0,00013 all'anno. Infine la prevalenza e l'incidenza della SLA sono più elevate negli uomini rispetto che nelle donne⁵ e aumenta anche con l'età raggiungendo il picco tra i 60 e i 79 anni⁶.

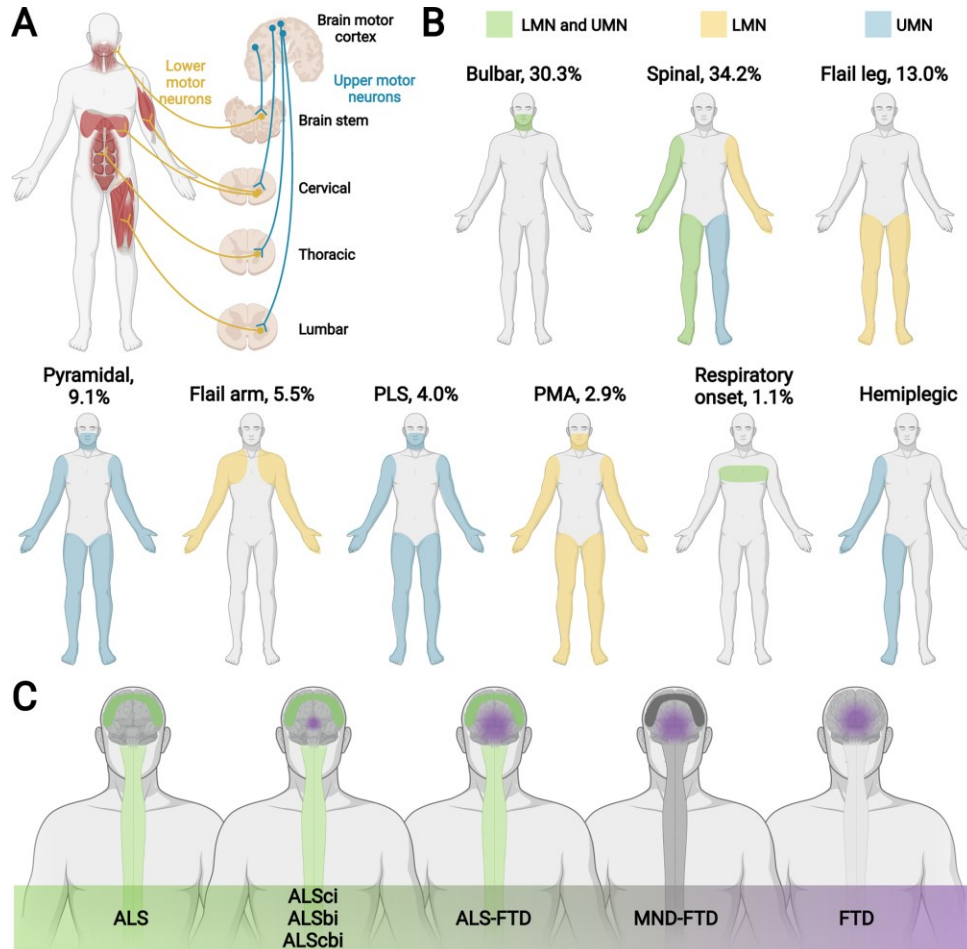


Figura 1.1 - (A) Lo schema mostra i UMN (blu), che trasmettono i segnali dalla corteccia motoria ai LMN (giallo), che trasmettono i segnali ai muscoli. **(B)** I pazienti con SLA possono presentare segni di disfunzione dei singoli UMN e LMN oppure una combinazione di essi (verde). **(C)** La SLA e la demenza frontotemporale (FTD) sono due patologie neurodegenerative distinte; tuttavia, esse condividono alterazioni neuropatologiche e molecolari che definiscono un continuum clinico-patologico. Di conseguenza, oltre ai disturbi motori legati alla neurodegenerazione degli MN (verde) potremo avere anche un deficit comportamentale e/o cognitivo derivante dalla neurodegenerazione frontotemporale (viola).⁶

1.2 Il motoneurone, l'unità di regolazione del movimento

Il MN è l'unità funzionale terminale della via motoria e costituisce l'elemento chiave nella trasmissione del comando nervoso dal sistema nervoso centrale (SNC) al muscolo scheletrico. Dal punto di vista anatomico, esso è caratterizzato da un corpo cellulare voluminoso, localizzato prevalentemente nel corno anteriore del midollo spinale o nei nuclei motori dei nervi cranici, da cui originano dendriti altamente ramificati e un assone mielinizzato di notevole lunghezza che raggiunge direttamente i muscoli dove genera la risposta motoria tramite le giunzioni neuromuscolari⁷.

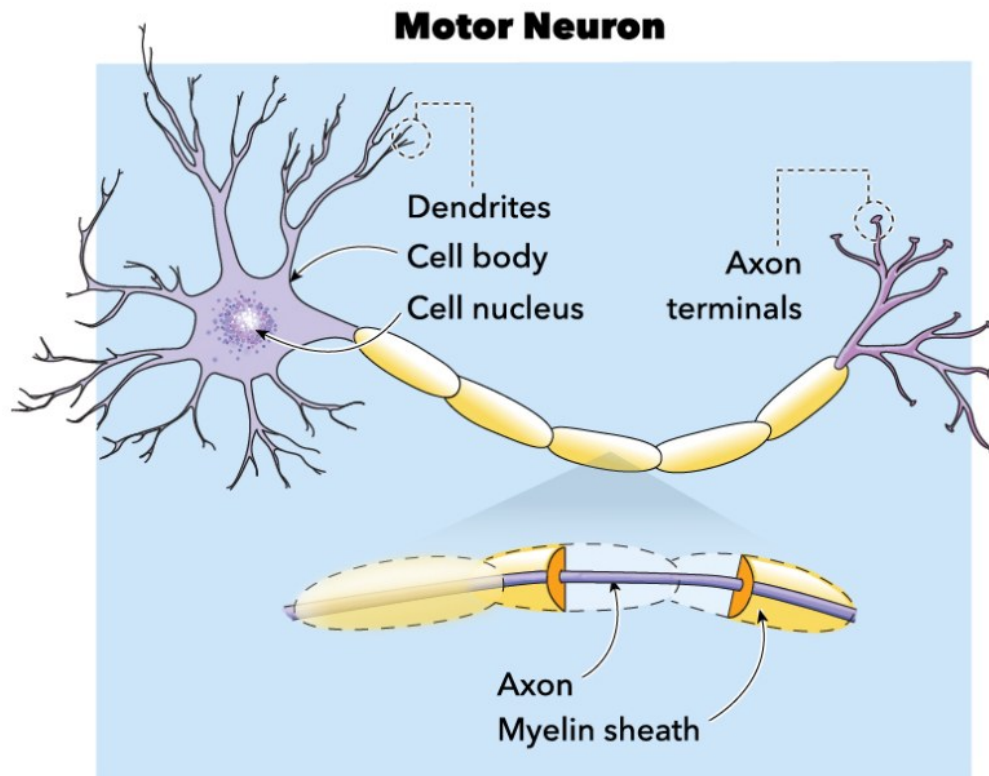


Figura 1.2 – *Illustrazione schematica dell'anatomia del MN, che evidenzia il corpo cellulare con il nucleo e i principali organelli, i dendriti ramificati e l'assone mielinizzato⁷.*

Gli MN si distinguono principalmente in due categorie: gli UMN, che hanno origine nella corteccia cerebrale, e gli LMN, situati nel tronco encefalico e nel midollo spinale. In particolare, i motoneuroni spinali (SpMN) risiedono nel corno ventrale del midollo spinale e innervano direttamente i muscoli periferici⁷. Di conseguenza, qualsiasi alterazione strutturale o funzionale dei SpMN, come avviene nella SLA, determina una compromissione diretta dell'esecuzione del movimento, con progressiva perdita della forza, della coordinazione e, infine, della capacità di generare contrazioni muscolari volontarie.

Il movimento volontario è regolato dal sistema motorio: comandi originano da neuroni corticali i cui assoni discendono verso tronco encefalico e midollo spinale e fanno sinapsi con gli MN del corno anteriore. I loro assoni escono dal SNC per modulare direttamente o indirettamente i muscoli scheletrici; un singolo MN può innervare molte fibre muscolari e, insieme alle fibre da esso raggiunte, costituisce l'unità motoria. Il MN è una cellula altamente specializzata che, tramite l'assone, rappresenta la via finale comune traducendo l'attività elettrica corticale e spinale in contrazione meccanica, permettendo movimenti coordinati e il mantenimento del tono posturale⁷.

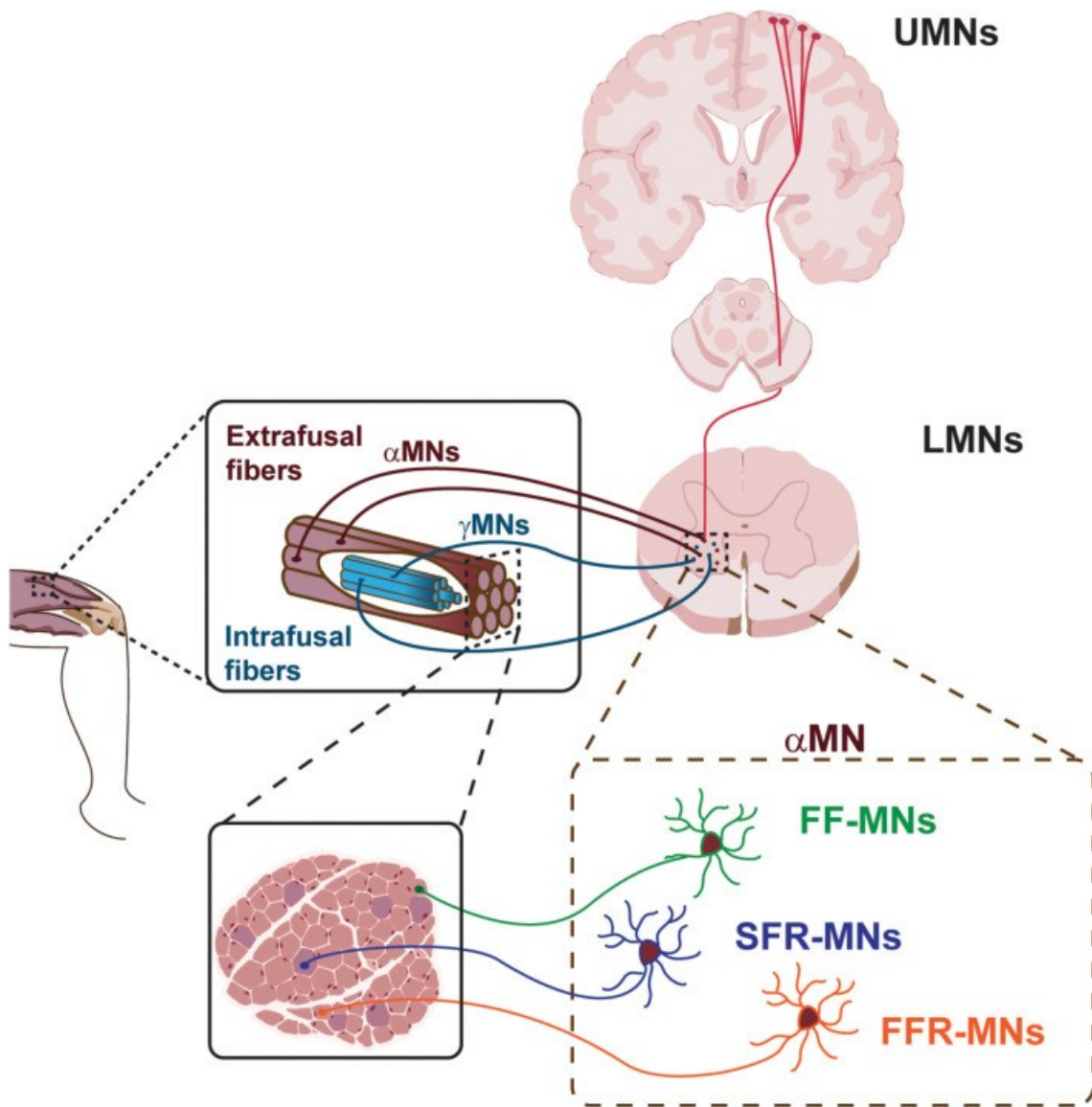


Figura 1.3 - Schema del sistema motorio. Gli UMN inviano le loro proiezioni ai LMN localizzati nel tronco encefalico e nel midollo spinale. Gli LMN, a loro volta, innervano le fibre muscolari scheletriche, permettendo l'esecuzione del movimento volontario. FF-MN: MN ad affaticamento rapido. SFR-MN: MN resistenti alla fatica lenta. FFR-MN: MN resistenti alla fatica rapida⁸.

Gli UMN sono grandi cellule piramidali localizzate principalmente nello strato 5 della corteccia cerebrale. Essi svolgono un ruolo fondamentale nell'inizio della maggior parte dei movimenti volontari, trasmettendo i comandi motori al midollo spinale

attraverso il tratto corticospinale e modulando direttamente l'attività degli interneuroni o dei LMN, i quali a loro volta inviano segnali ai muscoli scheletrici, determinando contrazione⁸.

Gli LMN possono essere classificati in maniera gerarchica in distinti sottotipi, sulla base della loro localizzazione nel tronco encefalico e nel midollo spinale, delle caratteristiche fisiologiche che li contraddistinguono e dei bersagli effettori che innervano. Inoltre, i neuroni che compongono un medesimo pool motorio possono essere ulteriormente distinti in tre sottogruppi sulla base del tipo di fibra muscolare che innervano, cioè neuroni motori alfa (α MN), neuroni motori beta (β MN) e neuroni motori gamma (γ MN)⁸.

Questa elevata specializzazione anatomo-funzionale rende il MN particolarmente vulnerabile a insulti metabolici, eccitotossici e a perturbazioni dell'omeostasi cellulare, come quelle che coinvolgono MERCs, lo ione calcio (Ca^{2+}) e metabolismo energetico. In particolare, molte delle alterazioni cellulari e molecolari che compromettono la sopravvivenza del MN si riflettono anche nelle sue connessioni periferiche, rendendo cruciale l'analisi della placca motrice come sito chiave per integrare eventi neuronali intrinseci e disfunzioni sinaptiche.

La placca motrice, o giunzione neuromuscolare, è una sinapsi altamente specializzata che consente la trasmissione del segnale tra il terminale presinaptico del MN e la fibra muscolare scheletrica. Il compartimento presinaptico è caratterizzato dalla presenza di vescicole sinaptiche contenenti acetilcolina e di zone attive deputate al rilascio quantico del neurotrasmettitore. Il versante postsinaptico è costituito dalla membrana della fibra muscolare, che presenta profonde pieghe postsinaptiche (junctional folds), le quali aumentano significativamente la superficie di contatto e la densità recettoriale. In queste regioni sono altamente concentrati i recettori nicotinici dell'acetilcolina, responsabili della depolarizzazione locale che innesca il potenziale d'azione muscolare. La lamina basale sinaptica, interposta tra i compartimenti pre- e postsinaptico, contiene proteine strutturali e funzionali, tra cui l'acetilcolinesterasi. Oltre ai componenti neuronali e muscolari, la placca motrice

comprende cellule gliali periferiche specializzate, le cellule di Schwann terminali (o perisinpatiche), che non solo contribuiscono alla stabilità e alla maturazione della giunzione neuromuscolare, ma partecipano attivamente ai processi di rimodellamento, rigenerazione e manutenzione sinaptica. Queste cellule modulano la trasmissione sinaptica attraverso il riassorbimento di neurotrasmettitori e ioni, il rilascio di fattori trofici e molecole segnale (es. neureguline), la rimozione di detriti e sinapsi difettose, e l'interazione con la matrice extracellulare e con molecole organizzatrici della sinapsi (es. agrina). Insieme agli elementi pre- e postsinaptici e alla matrice, le Schwann terminali contribuiscono a creare un microambiente dinamico e altamente organizzato che regola plasticità, sviluppo e resilienza della trasmissione neuromuscolare, con implicazioni per l'invecchiamento e le patologie neuromuscolari⁹.

L'integrità strutturale e funzionale della placca motrice dipende strettamente dalla salute del MN. Nelle patologie neurodegenerative del MN, come la SLA, alterazioni genetiche e molecolari possono compromettere precocemente la funzionalità sinaptica e l'interazione tra terminale presinaptico e fibra muscolare, favorendo la perdita di contatto sinaptico. In particolare, negli MN sono frequentemente riscontrati anche accumuli patologici di proteine mal ripiegate, tra cui la transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) e la superossido Dismutasi 1 (SOD1), che interferiscono con l'omeostasi cellulare, il trasporto assonale, la degradazione proteica e la segnalazione mitocondriale, contribuendo alla degenerazione progressiva del sistema neuromuscolare. Questi processi patologici possono portare a disfunzione sinaptica precoce prima della morte neuronale conclamata, suggerendo finestre terapeutiche per intervenire sulla stabilità della placca motrice¹⁰.

1.3 Eziopatogenesi della SLA: forma familiare e forma sporadica

Nonostante la patogenesi della SLA rimanga in larga misura non completamente chiarita allo stato attuale delle conoscenze scientifiche, è noto che la patologia presenta un'elevata eterogeneità clinica e biologica tra i diversi soggetti. Essa si manifesta in forme sporadiche e familiari, queste ultime spesso associate a mutazioni in geni specifici. L'andamento della malattia può variare considerevolmente in termini di esordio, velocità di progressione, distribuzione iniziale dei sintomi e risposta ai trattamenti sintomatici.

La forma più frequente è di tipo sporadico (sALS), colpisce circa 90-95% delle persone affette e non mostra una componente genetica evidente. Circa un decimo dei pazienti affetti da SLA sporadica può presentare però mutazioni patogene di tipo "private" nei geni associati alla SLA, cioè variazioni genetiche limitate a un singolo individuo e prive di una storia familiare della malattia. Per il restante 85% dei casi di sALS non è stata identificata alcuna causa nota¹¹. Tuttavia sono state formulate molteplici teorie con lo scopo di chiarire le cause della degenerazione neuronale nei soggetti interessati. Tra le ipotesi vi è l'eccitotossicità causata dal glutammato e lo stress ossidativo generato da uno squilibrio tra la produzione e l'eliminazione dei radicali liberi. Considerando la notevole vulnerabilità del SNC al danno ossidativo, tale squilibrio favorisce la disfunzione neuronale e la degenerazione. Inoltre, sono riportate anomalie nel trasporto assonale, malfunzionamenti degli astrociti, alterazioni mitocondriali nei neuroni e modifiche a livello delle cellule gliali.¹

La forma di SLA familiare (fALS) è tipicamente associata a un'eredità autosomica dominante con mutazioni genetiche note che si trasmettono in modo dominante all'interno della famiglia. Le mutazioni più frequentemente identificate interessano geni specifici come il Chromosome 9 open-reading frame 72 (C9orf72), SOD1 e Fused in Sarcoma (FUS) che sono stati ampiamente studiati e collegati a un aumentato rischio di sviluppare la malattia. Oltre a queste mutazioni "classiche", esiste una significativa varietà genetica:

numerosi geni e loci sono stati associati a mutazioni nei regolatori del DNA e dell'RNA, tra cui Transactive Response DNA-binding protein (TARDBP), che possono contribuire alla suscettibilità della SLA¹². La ricerca ha identificato più di 40 geni correlati alla SLA, evidenziando la complessità genetica di questa malattia¹¹.

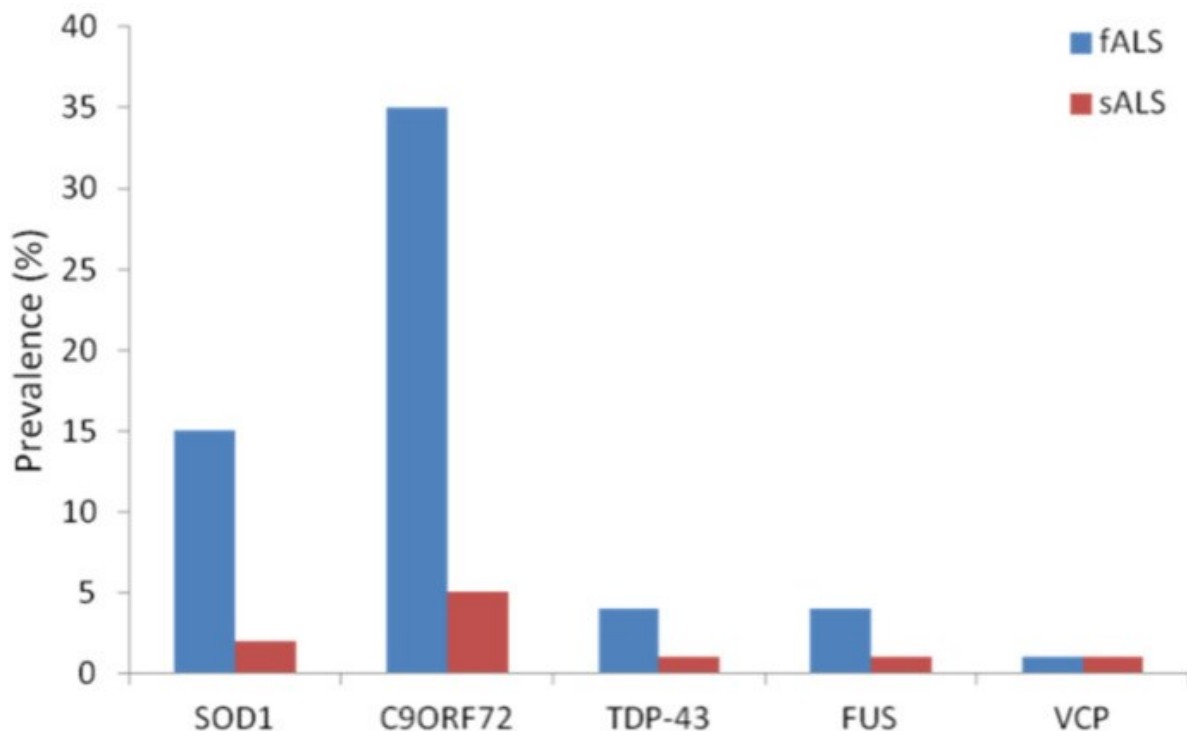


Figura 1.4 - Prevalenza (espressa in percentuale) delle mutazioni nei geni più rilevanti associati alla SLA nei casi fALS o sALS¹³

La **Figura 1.4** mostra che la causa genetica predominante è rappresentata dall'espansione patologica di una ripetizione di sei nucleotidi (GGGGCC, detta anche G4C2) nel locus C9orf72. Questa espansione, localizzata nel primo introne/5'-UTR del gene, può determinare da poche decine fino a diverse centinaia o migliaia di ripetizioni nei pazienti affetti; il numero di ripetizioni normali è tipicamente molto basso ($\leq 20-30$), mentre alleli patologici mostrano espansioni massicce associate alla malattia. L'espansione è la mutazione genetica più frequente nelle forme

familiari di SLA e FTD rilevata infatti in circa il 40% dei casi familiari e in circa il 12% di tutti i casi di SLA/FTD. Dal punto di vista molecolare, l'espansione di C9orf72 dà origine a più meccanismi patogenetici interconnessi. Primo, l'espansione può causare una diminuzione dell'espressione del trascritto e della proteina C9orf72, con conseguente alterazione di funzioni cellulari in cui C9orf72 è coinvolta, tra cui regolazione dell'endocitosi, del traffico vescicolare e dell'autofagia/immunità. Secondo, i trascritti contenenti le ripetizioni G4C2 formano RNA ripetuti sia sul filamento sense sia su quello antisense che tendono ad aggregare in foci nucleari e citoplasmatici; questi RNA di ripetizione possono sequestrare fattori di trascrizione, proteine coinvolte nello splicing e nel trasporto degli RNA, alterando l'omeostasi dell'RNA. Terzo, tramite un meccanismo denominato RAN translation (Repeat-Associated Non-AUG translation), dalle ripetizioni vengono tradotte proteine ricche di dipeptidi ripetuti (dipeptide repeat proteins, DPR), come poly-GA, poly-GP, poly-GR, poly-PR e poly-PA, che accumulandosi formano inclusi proteici altamente tossici per gli MN, interferendo con la funzione ribosomiale, la proteostasi e il metabolismo energetico¹⁴.

Ritornando a quanto illustrato nella **Figura 1.4**, si osserva che la variante SOD1 costituisce la seconda principale area di origine di fALS e, seppur meno frequentemente, è rilevante anche in alcuni casi di sALS. Le mutazioni nel gene SOD1 associate a fALS sono responsabili di circa il 15–20% dei casi familiari, nelle forme sporadiche la loro incidenza è molto più bassa, ma rimangono uno dei modelli genetici più studiati per comprendere i meccanismi molecolari della degenerazione degli MN. SOD1 codifica la superossido dismutasi 1, è un enzima citosolico che catalizza la conversione dell'anione superossido in perossido di idrogeno e ossigeno, contribuendo alla difesa antiossidante cellulare. Molte mutazioni patologiche compromettono il corretto ripiegamento della proteina, la coordinazione degli ioni rame e zinco o la formazione del ponte disolfuro intramolecolare, favorendo il rilascio di specie proteiche parzialmente mal ripiegate che tendono ad oligomerizzare e aggregare. Tali aggregati di SOD1 possono esercitare una tossicità attraverso molteplici meccanismi: perdita della funzione antiossidante, acquisizione

di una funzione tossica, induzione di stress proteostatico, disfunzione mitocondriale e perturbazione del traffico e dell'omeostasi di Ca^{2+} . A livello subcellulare, mutazioni di SOD1 sono state collegate a disfunzioni mitocondriali precoci, alterazioni dei MERCs e aumento dello stress del reticolo endoplasmatico (ER), fenomeni che promuovono l'apoptosi e la vulnerabilità degli MN. Inoltre, evidenze sperimentali indicano che la patogenicità di SOD1 non sia limitata ai soli neuroni, ma coinvolga cellule gliali e muscolari, le quali possono modulare la progressione del danno neuronale mediante meccanismi come il rilascio di fattori tossici, la compromissione del supporto metabolico e alterazioni dell'interazione neurone–glia. Ad oggi sono state riportate numerose mutazioni SOD1 associate a SLA, con oltre 180 variazioni identificate, che mostrano una ampia varietà di fenotipi clinici e velocità di progressione¹³.

Un'ulteriore proteina frequentemente alterata nei pazienti con SLA è la TDP-43, un fattore nucleare legante DNA/RNA implicato nello splicing, nel trasporto e nella stabilità dell'RNA. Mutazioni in TDP-43 sono presenti in circa il 4% dei casi di fALS, ma alterazioni della sua localizzazione e aggregazione sono comuni anche nella sALS. È tuttora dibattuto se la patogenesi derivi principalmente dalla perdita della funzione nucleare o da una tossicità da acquisto di funzione citoplasmatica; la perdita nucleare può compromettere lo splicing e la regolazione della cromatina, mentre la dislocalizzazione e l'aggregazione citoplasmatiche sono associate a stress neuronale. Studi recenti indicano inoltre che la disfunzione di TDP-43 può coinvolgere i mitocondri: la mislocalizzazione citoplasmatica favorisce l'accumulo di TDP-43 in prossimità dei mitocondri, promuovendo il rilascio di DNA mitocondriale che attiva risposte innate pro-infiammatorie e l'attivazione anomala di pathway come NF- κ B (p65) in neuroni e cellule gliali del midollo spinale, contribuendo alla neuroinfiammazione osservata nella SLA¹⁵.

Proseguendo con l'analisi delle mutazioni risultano rilevanti, seppur con minore casistica, anche la mutazione FUS e Valosin Containing Protein (VCP). La mutazione di FUS è associata a un inizio precoce di SLA. La variante mutata di FUS tende a depositarsi nei granuli di stress (SG) all'interno delle cellule,

influenzandone sia la composizione sia la dinamica, con conseguenze dirette sulla gestione dello stress cellulare. FUS è coinvolto in molte tappe dell'elaborazione del DNA e dell'RNA, inclusa la riparazione del DNA, la trascrizione, lo splicing dell'RNA e il trasporto nucleocitoplasmatico dell'RNA¹⁶. La proteina VCP, invece, è coinvolta nei meccanismi di controllo della qualità proteica. Ad oggi sono state descritte oltre 50 mutazioni patogene del gene VCP associate a quadri clinici neurodegenerativi¹⁷.

1.4 La Demenza Frontotemporale nello spettro SLA-FTD

Negli ultimi vent'anni è cresciuta la consapevolezza che la SLA sia un disturbo multisistemico infatti non colpisce solo gli MN ma, con grado variabile, interessa anche ulteriori circuiti neuronali. In particolare, si riscontrano alterazioni cognitive e del comportamento correlate a modificazioni sia strutturali sia funzionali delle reti frontotemporali. Tali alterazioni possono manifestarsi con deficit delle funzioni esecutive, modificazioni del comportamento e della personalità, alterata socialità e un deterioramento delle capacità di memoria di lavoro¹¹.

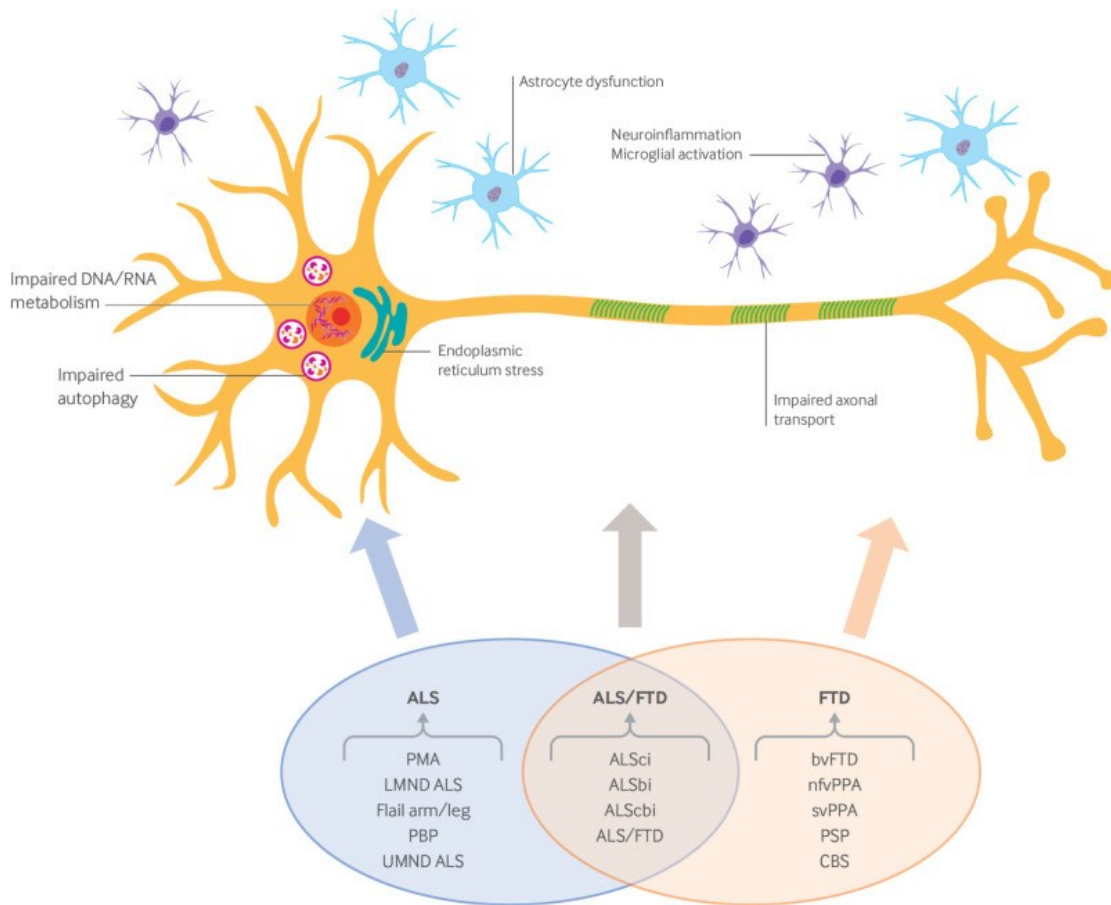


Figura 1.5 - schema delle sindromi cliniche e meccanismi patologici che contribuiscono alla neurodegenerazione. Distinzione tra pazienti affetti da SLA con deterioramento cognitivo, SLA con deterioramento comportamentale, SLA con deterioramento cognitivo associato a quello comportamentale, SLA con demenza frontotemporale (SLA-FTD)⁵.

L'anomalia neuropsicologica è correlata a una progressione accelerata della malattia e a una riduzione della sopravvivenza, riscontrandosi con maggiore frequenza nelle fasi avanzate. I sintomi motori possono mascherare i segnali neuropsicologici precedenti o concomitanti; per questo risulta fondamentale eseguire screening specifici e, in caso di anomalie, effettuare una valutazione neuropsicologica più approfondita, capace di identificare i cambiamenti cognitivi e/o comportamentali⁵.

Questo aspetto va considerato nel contesto della gestione multidisciplinare della SLA-FTD, integrando valutazioni neuropsicologiche mirate e interventi riabilitativi adattati alle esigenze cognitive ed emotive.

1.5 Meccanismi di patogenesi alterati

Come già indicato in precedenza la causa primaria della SLA non è stata ancora determinata ma sono state avanzate diverse ipotesi per spiegare i meccanismi alla base del danno neuronale caratteristico di questa patologia. Diversi percorsi eziologici sono stati indagati, considerando sia fattori genetici sia fattori ambientali, che possono interagire tra loro in modo complementare¹.

Tra le possibili cause identificate, oltre alle alterazioni genetiche, rientrano:

- Disfunzione mitocondriale
- stress ossidativo
- neuroinfiammazione²
- eccitotossicità del glutammato¹

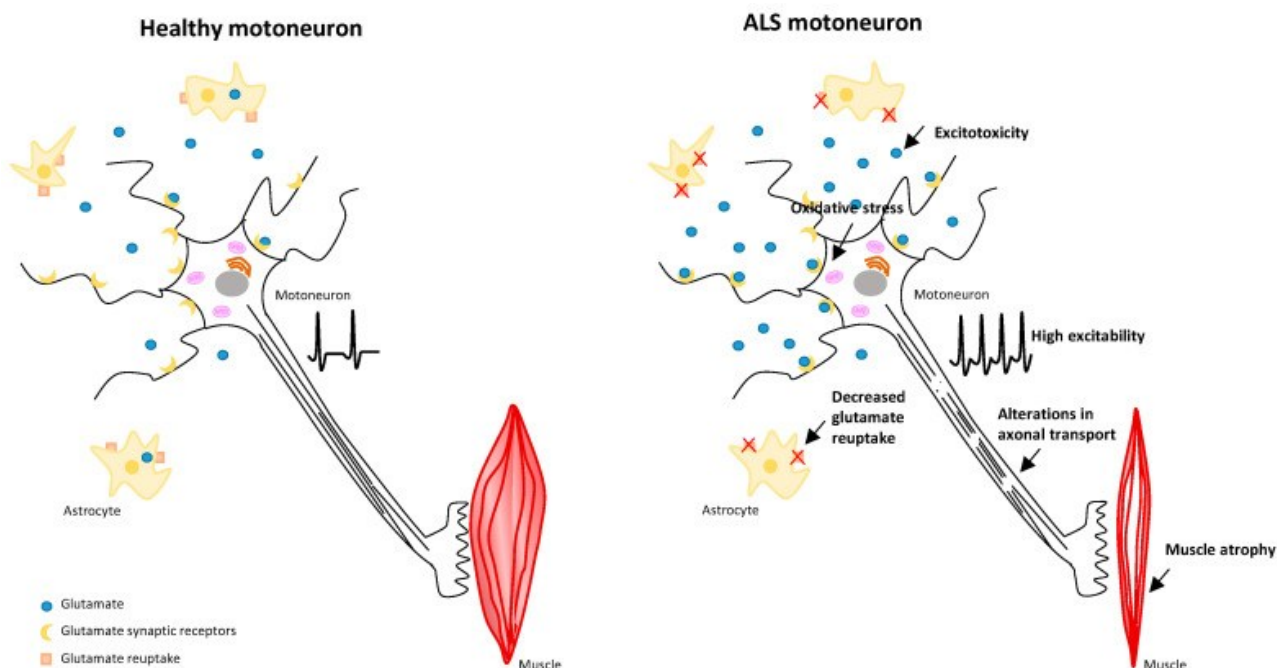


Figura 1.6 - rappresentazione schematica delle differenze tra MN sano e MN dei soggetti affetti da SLA¹.

Disfunzione mitocondriale: Nella SLA le alterazioni mitocondriali, comprese disfunzioni nella fusione/fissione e nel trasporto, causano organelli morfologicamente e funzionalmente compromessi e una rete mitocondriale con una alterata localizzazione. Studi in vitro, modelli animali e campioni umani riportano ridotta attività della catena respiratoria e di enzimi mitocondriali, alterata gestione energetica e maggiore vulnerabilità allo stress ossidativo, suggerendo un ruolo determinante della disfunzione mitocondriale nella degenerazione degli MN¹⁸.

Stress ossidativo: Esso può derivare da una produzione eccessiva di ROS, potenzialmente alla base della disfunzione mitocondriale. L'iperproduzione di ROS può causare perossidazione lipidica, ossidazione proteica e mutazioni del DNA.¹

Neuroinfiammazione: La neuroinfiammazione, con astrociti e microglia reattivi, infiltrazione moderata di cellule immunitarie periferiche e livelli elevati di mediatori infiammatori, coinvolge le regioni motorie del SNC nella SLA. Gli astrociti normali promuovono un ambiente fisiologico favorevole alla funzione

neuronale. Tuttavia, nella SLA, gli astrociti mostrano potenziali effetti nocivi sugli MN. Nei pazienti affetti da SLA e nei modelli animali, gli astrociti presentano ipertrofia e proliferazione anomala. Per quanto riguarda la microglia, essa rappresenta la principale cellula immunitaria presente nel cervello e nel midollo spinale. Funziona da prima linea di difesa immunitaria nel SNC, sorvegliando l'ambiente circostante tramite i processi cellulari. La microglia risulta sensibile a variazioni patologiche del SNC¹⁹.

Eccitotossicità del glutammato: nel SNC il glutammato costituisce il principale mediatore della trasmissione eccitatoria. Una stimolazione prolungata porta a ipereccitabilità, con potenziale degenerazione o morte cellulare. Elevati livelli o maggiore sensibilità dei neuroni al glutammato favoriscono una stimolazione eccessiva dei recettori. Inoltre, nel liquido cerebrospinale di pazienti con SLA si osservano concentrazioni aumentate di glutammato, dovute a ricaptazione compromessa e perdita di trasportatori degli astrociti¹.

Continuando ad analizzare le alterazioni fisiopatologiche della SLA nell'ultimo decennio è emersa la consapevolezza che i mitocondri e l'ER possono instaurare contatti, influenzando un'ampia gamma di processi intracellulari. Le ricerche, infatti, comprovano l'esistenza di una connessione strutturale e funzionale tra ER e mitocondri tramite giunzioni specializzate denominate MERCs²⁰. Tali siti sono strettamente associati a varie funzioni fisiologiche, tra cui il trasporto intracellulare dei lipidi, il trasferimento di Ca^{2+} , il mantenimento della funzione mitocondriale; per queste ragioni alterazioni dei MERCs sono associate a numerose patologie, tra cui quelle neurodegenerative come nel caso della SLA³.

Capitolo II

2.1 Mitocondrio e reticolo endoplasmatico: basi biologiche per lo studio dei MERCS

Nelle cellule eucariotiche, mitocondri e l'ER costituiscono due organelli essenziali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, collaborando nella regolazione del metabolismo energetico, della segnalazione del Ca^{2+} e della biosintesi dei lipidi.

I mitocondri sono comunemente definiti le "centrali energetiche" della cellula poiché sono coinvolti nel metabolismo energetico della cellula, garantiscono la sintesi di ATP, processo che si svolge a livello della membrana interna mitocondriale (IMM). In aggiunta, prendono parte a numerosi altri aspetti del metabolismo e delle funzioni cellulari, contribuendo alla regolazione dell'omeostasi ionica, della proliferazione cellulare, dello stato redox e dei processi di segnalazione intracellulare, all'omeostasi del Ca^{2+} ; di conseguenza, rivestono un ruolo chiave sia nei meccanismi di sopravvivenza sia in quelli di morte cellulare. Proprio in virtù di questa funzione centrale nel controllo della vita e della morte delle cellule, i mitocondri risultano implicati anche nella genesi e nella progressione di molte malattie umane, tra cui, il cancro, le patologie neurodegenerative e cardiovascolari, il diabete, i traumi cranici e i processi infiammatori²¹.

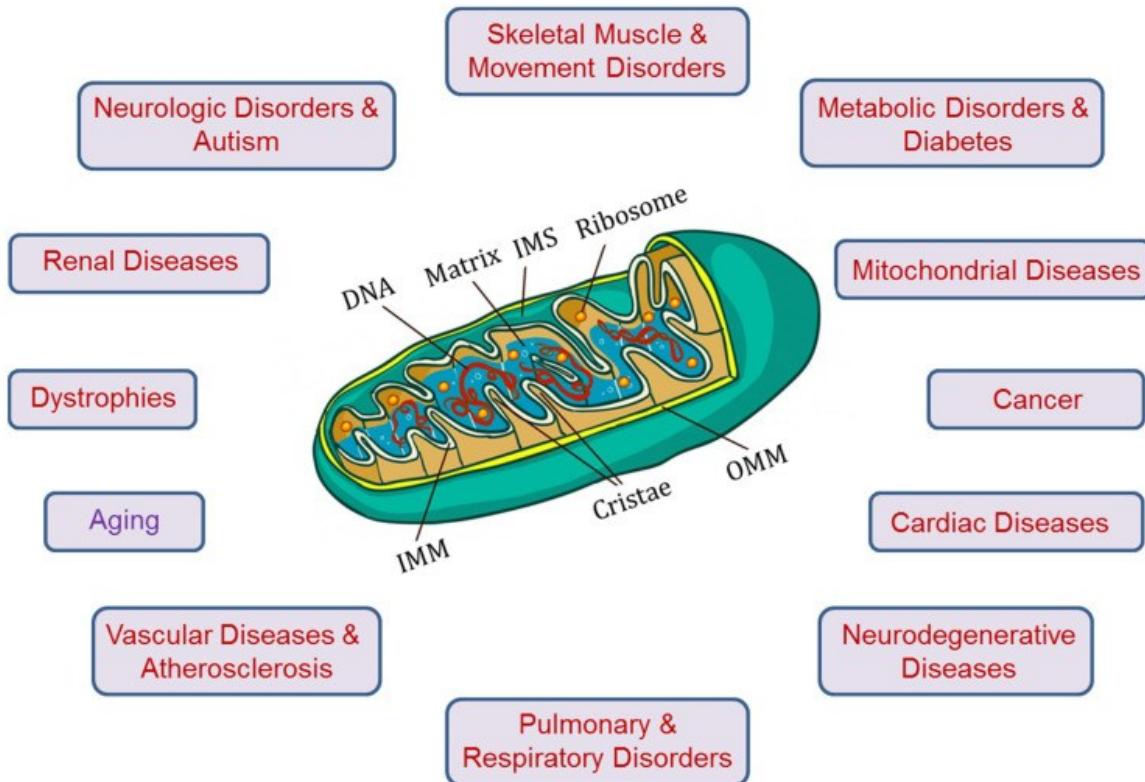


Figura 2.1 - Illustrazione schematica di un mitocondrio. Questi organelli rivestono un ruolo cruciale nello sviluppo di numerose patologie umane e nei processi biologici correlati all'invecchiamento. IMM: membrana mitocondriale interna; IMS: spazio intermembrana; OMM: membrana mitocondriale esterna²¹.

Un altro organello indispensabile per il corretto funzionamento della cellula è l'ER, una struttura delimitata da membrana che sovrintende ai processi di sintesi, corretta conformazione, maturazione e distribuzione intracellulare delle proteine. Inoltre, l'ER riveste un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare e nella regolazione del metabolismo dei lipidi. Esso si articola in due distinte subregioni: il reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e il reticolo endoplasmatico liscio (REL), le quali si differenziano principalmente per la presenza o l'assenza di ribosomi sulla superficie citoplasmatica e per le specifiche funzioni svolte nell'ambito della sintesi proteica e lipidica²².

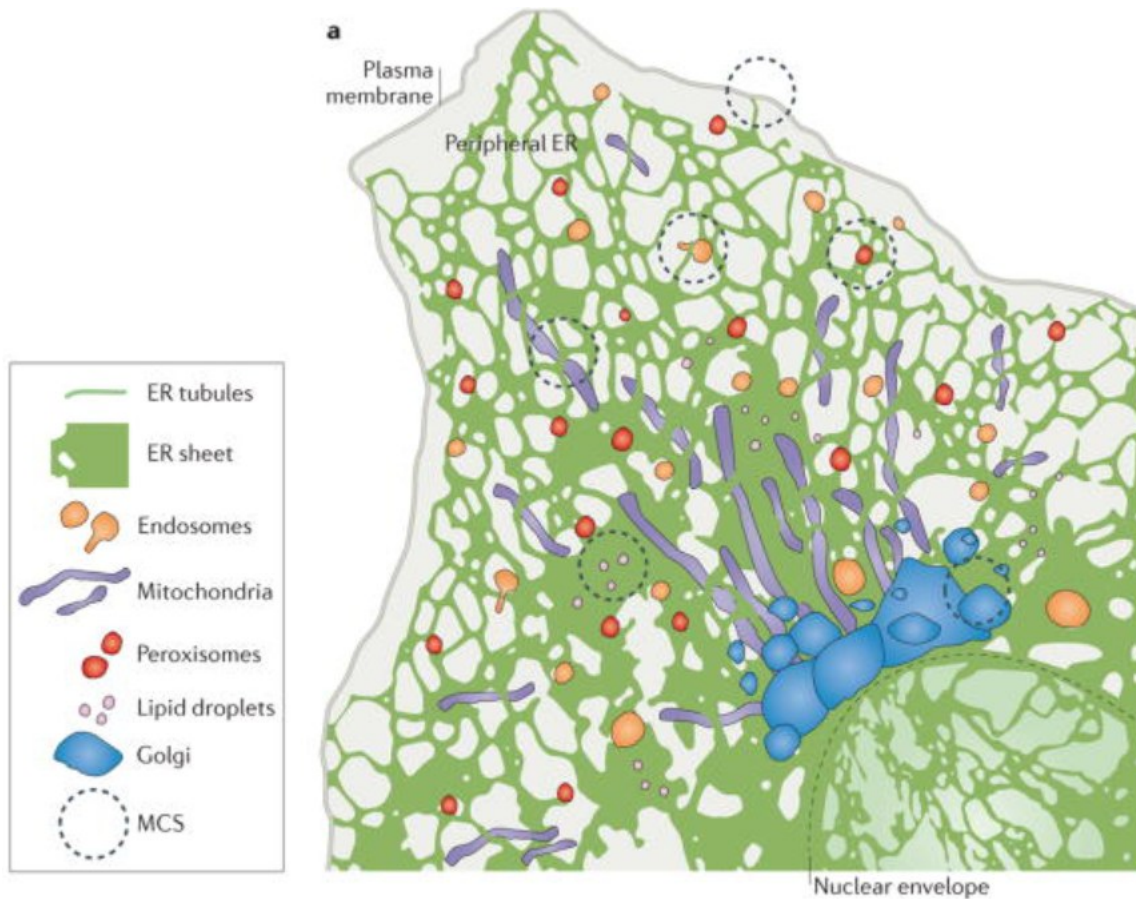


Figura 2.2 – organizzazione strutturale dell'ER²³.

Pur mantenendo funzioni specifiche, oggi è ampiamente accettato che mitocondri ed ER non agiscano in modo isolato, ma siano inseriti in una complessa rete di comunicazione tra organelli, che permette un coordinamento preciso dei processi condivisi e una risposta appropriata alle variazioni delle condizioni fisiologiche e agli stimoli stressogeni²⁴. In questo contesto, il mitocondrio e l'ER emergono come organelli altamente specializzati ma intimamente interdipendenti, la cui integrazione funzionale è cruciale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, della biosintesi lipidica e della risposta allo stress proteotossico in particolare nei neuroni e nelle cellule coinvolte nella SLA. Le evidenze accumulate negli ultimi decenni hanno progressivamente messo in discussione una visione "isolata" degli organelli,

aprendo la strada al concetto di interfacce fisiche e funzionali stabili tra mitocondrio ed ER; nei capitoli successivi verranno quindi approfondite la scoperta e la caratterizzazione dei MERCs, intesi come nodi organizzativi chiave di questa comunicazione inter-organellare.

2.2 La scoperta dei MERCs

I siti di contatto di membrana sono tradizionalmente descritti come regioni in cui le membrane di due organelli risultano strettamente accostate senza fusione. Finora sono stati identificati sia contatti omotipici, ossia tra organelli dello stesso tipo, sia contatti eterotipici, che si instaurano tra organelli differenti o tra differenti domini di membrana. Tra questi, un ruolo di particolare rilievo è stato attribuito all'ER, che funge da piattaforma centrale di interazione con molteplici organelli intracellulari. In questo contesto, i contatti eterotipici inizialmente più indagati hanno visto come protagonista l'ER nelle sue interazioni con i mitocondri. I siti di contatto tra mitocondri ed ER, noti come MERCs. Variazioni nella struttura, nella composizione e nella dinamica di questi contatti sono strettamente correlate all'insorgenza di importanti patologie umane, in particolare disturbi neurodegenerativi e neoplasie²⁵.

Le prime evidenze dell'esistenza di una stretta associazione fisica tra mitocondrio ed ER risalgono agli anni Cinquanta del Novecento, quando studi di microscopia elettronica a trasmissione mostrarono per la prima volta regioni di stretta apposizione tra le due membrane²⁶. Successivamente, Copeland e Dalton osservarono una stretta associazione strutturale tra mitocondrio e cisterne dell'ER nelle cellule della ghiandola pseudobranchiale di un pesce teleosteo, suggerendo che tali giunzioni potessero rappresentare siti privilegiati per lo scambio di segnali e metaboliti tra i due organelli²⁷.

Un progresso decisivo nella comprensione dei MERCs si ebbe negli anni Settanta, quando l'uso combinato della microscopia elettronica e delle prime metodiche di frazionamento subcellulare rese possibili una descrizione più sistematica delle zone di stretto contatto tra ER e mitocondri. Nel corso delle procedure di isolamento dei mitocondri da tessuti di mammifero, diversi gruppi di ricerca notarono la presenza costante di porzioni di membrana dell'ER aderenti alla superficie mitocondriale, nonostante protocolli di purificazione sempre più rigorosi, suggerendo l'esistenza di domini di interazione estremamente stabili e dotati di specifiche funzioni²⁸.

La svolta nello studio dei MERCs si ebbe nel 1990 grazie al lavoro di Jean E. Vance, che fornì una prima dimostrazione biochimica solida dell'esistenza di domini specializzati di interazione funzionale tra ER e mitocondri. Utilizzando epatociti di ratto, Vance isolò una frazione di membrana distinta sia dai mitocondri purificati sia dall'ER convenzionale. Questa frazione risultò:

- fisicamente associata ai mitocondri
- arricchita in enzimi fondamentali per la sintesi dei fosfolipidi
- funzionalmente differente rispetto agli altri compartimenti cellulari²⁹.

Questo studio dimostrò per la prima volta che il contatto tra ER e mitocondri non fosse soltanto strutturale, ma anche funzionalmente rilevante, introducendo il concetto di trasferimento diretto di metaboliti tra organelli.

Più recentemente è emerso come l'ER contribuisca alla regolazione della fissione mitocondriale ed endosomiale proprio in corrispondenza dei punti di contatto con questi organelli, sottolineando la natura estremamente dinamica e multifunzionale di tali strutture³⁰.

Parallelamente, il progresso delle tecnologie di microscopia e di biologia molecolare consentì l'identificazione di numerose proteine diverse residenti nei MERCs responsabili del mantenimento della distanza ottimale tra le membrane dei due

organelli³¹. Tali scoperte contribuirono in maniera determinante all'affinamento concettuale e all'evoluzione della definizione di MERCs.

In conclusione, l'identificazione e lo studio dei MERCs rappresentano un esempio paradigmatico di come strutture inizialmente ritenute semplici elementi passivi dell'architettura cellulare possano invece emergere come nodi funzionali essenziali nella biologia cellulare.

2.3 Funzioni dei MERCs

La comprensione delle funzioni dei MERCs è emersa da osservazioni morfologiche e ultrastrutturali che ne hanno permesso l'identificazione, rivelando l'ER e i mitocondri come vere e proprie piattaforme operative essenziali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare; in questo paragrafo verranno dunque approfondite le principali funzioni fisiologiche attribuite ai MERCs, tra cui la modulazione della segnalazione mediata dal Ca^{2+} , il trasferimento di lipidi tra le due membrane, la regolazione del metabolismo energetico e l'innescò delle risposte allo stress cellulare, fornendo le basi concettuali per comprenderne il ruolo nella patogenesi della SLA³².

Una delle funzioni più studiate e consolidate dei MERCs riguarda la regolazione del trasferimento di Ca^{2+} tra ER e mitocondri. L'ER rappresenta il principale serbatoio di Ca^{2+} intracellulare, rilasciato in modo controllato attraverso recettori specifici come i recettori per l'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3R) localizzati proprio nelle regioni di contatto con i mitocondri. A livello dei MERCs, la stretta apposizione tra le due membrane consente la formazione di microdomini di Ca^{2+} ad alta concentrazione che facilitano l'ingresso rapido dello ione nel mitocondrio attraverso il canale anionico voltaggio-dipendente 1 (VDAC1), garantendo così un efficiente accoppiamento tra segnali di Ca^{2+} e produzione di ATP³³. L'ingresso del Ca^{2+} nel mitocondrio svolge un ruolo cruciale nella regolazione del metabolismo energetico,

poiché diversi enzimi del ciclo di Krebs risultano sensibili e dipendenti da questo ione. In questo modo, il trasferimento di Ca^{2+} attraverso i MERCs collega direttamente l'attività metabolica mitocondriale alle variazioni dei segnali di Ca^{2+} citosolico, coordinando la produzione di ATP con le esigenze funzionali della cellula³². Tuttavia, un eccessivo accumulo di Ca^{2+} nei mitocondri può risultare dannoso poiché promuove l'apertura del poro di transizione mitocondriale della permeabilità (mPTP), la perdita del potenziale di membrana e l'attivazione di vie apoptotiche. I MERCs rappresentano quindi un nodo critico nella regolazione di questi flussi di Ca^{2+} , fungendo da piattaforma strutturale e funzionale che integra segnali pro-sopravvivenza e pro-morte cellulare³³.

Il trasferimento dello ione calcio è garantito da un complesso proteico costituito principalmente da IP3R localizzato sulla membrana dell'ER, dalla proteina chaperonica 75 regolata dal glucosio (GRP75) che funge da ponte molecolare, e dal canale VDAC situato sulla membrana esterna mitocondriale. L'IP3R è un canale per il Ca^{2+} che, in risposta al legame con l'inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3), media il rilascio di Ca^{2+} dal lume dell'ER verso lo spazio citosolico, generando microdomini di alta concentrazione di Ca^{2+} in prossimità dei punti di contatto con i mitocondri. A questo punto interviene la GRP75 che agisce come proteina adattatrice che collega fisicamente l'IP3R sulla membrana dell'ER a VDAC1 sulla membrana esterna mitocondriale. Questa disposizione spaziale consente un trasferimento rapido ed efficiente degli ioni calcio verso i mitocondri, favorendo l'attivazione della deidrogenasi del ciclo di Krebs e, conseguentemente, la produzione di ATP³⁴. Oltre al trasferimento di Ca^{2+} mediato da IP3R, VDAC1 e GRP75, un elemento chiave per l'ingresso dello ione calcio all'interno dei mitocondri è il Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU). L'MCU è la subunità formante il poro di un complesso multiproteico localizzato nella membrana mitocondriale interna che comprende, oltre alla subunità MCU, regolatori essenziali quali MICU1, MICU2 e EMRE; questi elementi modulano l'ingresso di Ca^{2+} in funzione del potenziale di membrana e della concentrazione di Ca^{2+} nello spazio intermembrana. Il complesso MCU permette un

rapido e selettivo accumulo di Ca^{2+} nella matrice mitocondriale in risposta a segnali prolungati o localmente concentrati provenienti dai MERCs³⁵.

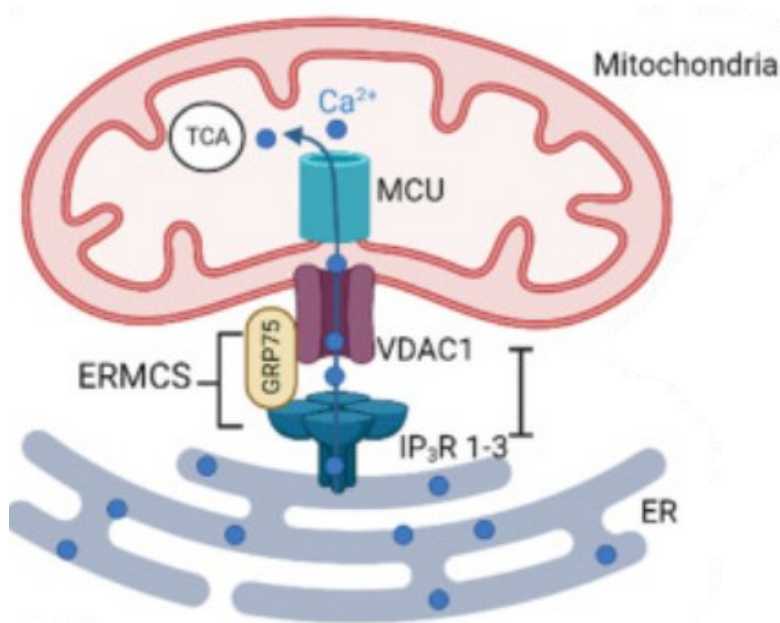


Figura 2.5 - rappresentazione schematica del trasferimento di Ca^{2+} mediato dal complesso proteico IP₃R–GRP75–VDAC³⁶.

Al macrocomplesso proteico IP₃R-GRP75-VDAC1 si associa un'ulteriore proteina ovvero la DJ-1. Essa è coinvolta nella risposta allo stress ossidativo e nella regolazione dell'omeostasi mitocondriale, agendo come chaperone redox-sensibile e modulando l'interazione funzionale tra ER e mitocondri. La perdita di DJ-1 riduce la formazione fisica dei MERCs e compromette il trasferimento di Ca^{2+} dall'ER ai mitocondri, determinando una diminuzione dell'attività della catena respiratoria e un aumento della vulnerabilità cellulare allo stress ossidativo³⁷.

Oltre a mediare la segnalazione del Ca^{2+} , i MERCs ricoprono un ruolo chiave nel metabolismo dei lipidi. In origine, infatti, sono state descritte come frazioni di membrana particolarmente arricchite in enzimi deputati alla sintesi e al trasferimento

dei fosfolipidi tra ER e il mitocondrio. Di conseguenza, alterazioni della distribuzione dei MERCs potrebbero modulare in maniera discreta la capacità di trasferimento, configurandosi come un parametro chiave per la regolazione del metabolismo lipidico intracellulare³².

I MERCs svolgono un ruolo cruciale anche nella regolazione della dinamica mitocondriale, intervenendo in processi quali fusione e fissione. Studi di microscopia avanzata hanno dimostrato che l'ER può formare strutture che avvolgono parzialmente i mitocondri, fungendo da piattaforma di reclutamento per le proteine chiave della fissione mitocondriale modulando così, in maniera spazialmente e temporalmente coordinata, la segmentazione del reticolo mitocondriale³³.

Proseguendo nell'analisi delle funzioni dei MERCs, è attualmente noto che esse sono coinvolte in un processo di autofagia selettiva dei mitocondri, noto come mitofagia. Queste giunzioni favoriscono infatti il reclutamento e l'assemblaggio di proteine dell'autofagia come ATG14L e Beclin-1, promuovendo la produzione locale di PI3P (fosfatidilinositolo 3-fosfato) e la formazione di omegasomi a partire dalla membrana ER contigua ai mitocondri. Consentono l'attivazione coordinata di chinasi e complessi (es. ULK1, Vps34) per la nucleazione ed espansione del fagoforo. A livello mitocondriale, segnali di danno quali l'accumulo di PINK1, reclutamento di Parkin, alterazioni di proteine di contatto come la mitofusina 2 vengono integrati ai MERCs per selezionare mitocondri danneggiati da eliminare tramite mitofagia; anche il controllo del Ca^{2+} e il trasferimento lipidico modulano la soglia di attivazione. Nei neuroni i MERCs bilanciano rimozione selettiva e preservazione della riserva mitocondriale, contribuendo a proteggere la funzione sinaptica e a limitare l'accumulo di proteine tossiche³⁸.

I MERCs svolgono un ulteriore ruolo cruciale nella modulazione della risposta cellulare agli stimoli stressogeni e nel mantenimento dell'omeostasi redox. L'ER e il mitocondrio costituiscono infatti i principali distretti coinvolti sia nella gestione dello stress proteico sia nella generazione ROS, rendendo indispensabile una comunicazione funzionale strettamente coordinata tra questi due organelli³⁹.

Durante condizioni di stress dell'ER, caratterizzate da un accumulo di proteine mal ripiegate e da un'alterata omeostasi del Ca^{2+} , si attiva la risposta UPR (unfolded protein response). Componenti chiave di questa via includono i sensori di membrana PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), IRE1 (Inositol requiring enzyme 1) e ATF6 (fattore di trascrizione attivante 6), che rilevano il carico proteico anomalo e modulano l'espressione genica e la traduzione proteica al fine di ripristinare l'omeostasi cellulare⁴⁰. In condizioni di stress moderato, una UPR attivata in modo controllato può favorire il ripristino dell'omeostasi proteica aumentando temporaneamente la capacità di folding e la degradazione delle proteine mal ripiegate, promuovendo così il rimodellamento mitocondriale e il mantenimento della funzione cellulare. Al contrario, in condizioni di stress cronico e severo, la persistenza di uno stato di UPR attivata può determinare un aumento del flusso di Ca^{2+} , contribuendo all'innescamento di vie pro-apoptotiche e alla progressiva compromissione della sopravvivenza neuronale³⁹. In relazione alla regolazione dello stato redox, sia l'ER sia i mitocondri rappresentano fonti significative di ROS. Nell'ER, la formazione dei legami disolfuro durante il folding proteico genera ROS, mentre nei mitocondri la principale sorgente di tali radicali è costituita dalla catena di trasporto degli elettroni. In questo contesto, i MERCs si configurano come un nodo critico in cui produzione e detossificazione dei ROS risultano finemente bilanciate. Tuttavia, un'eccessiva o prolungata produzione di ROS può risultare deleteria, inducendo danno ossidativo a lipidi, proteine e acidi nucleici⁴¹. Alterazioni strutturali e funzionali dei MERCs sono state collegate all'invecchiamento cellulare e alla senescenza: cambiamenti nei segnali redox e nello stress dell'ER danneggiano i mitocondri e compromettono l'omeostasi cellulare. I MERCs pertanto hanno un ruolo fondamentale nella regolazione dello stress cellulare e dell'equilibrio redox, influenzando direttamente la sopravvivenza neuronale e la vulnerabilità selettiva degli MN.

In sintesi, come evidenziato nella **Figura 2.4**, i MERCs si configurano come nodi funzionali critici nei quali convergono la regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} , il

metabolismo lipidico, il controllo della dinamica mitocondriale, i processi di mitofagia e la risposta allo stress proteotossico e ossidativo.

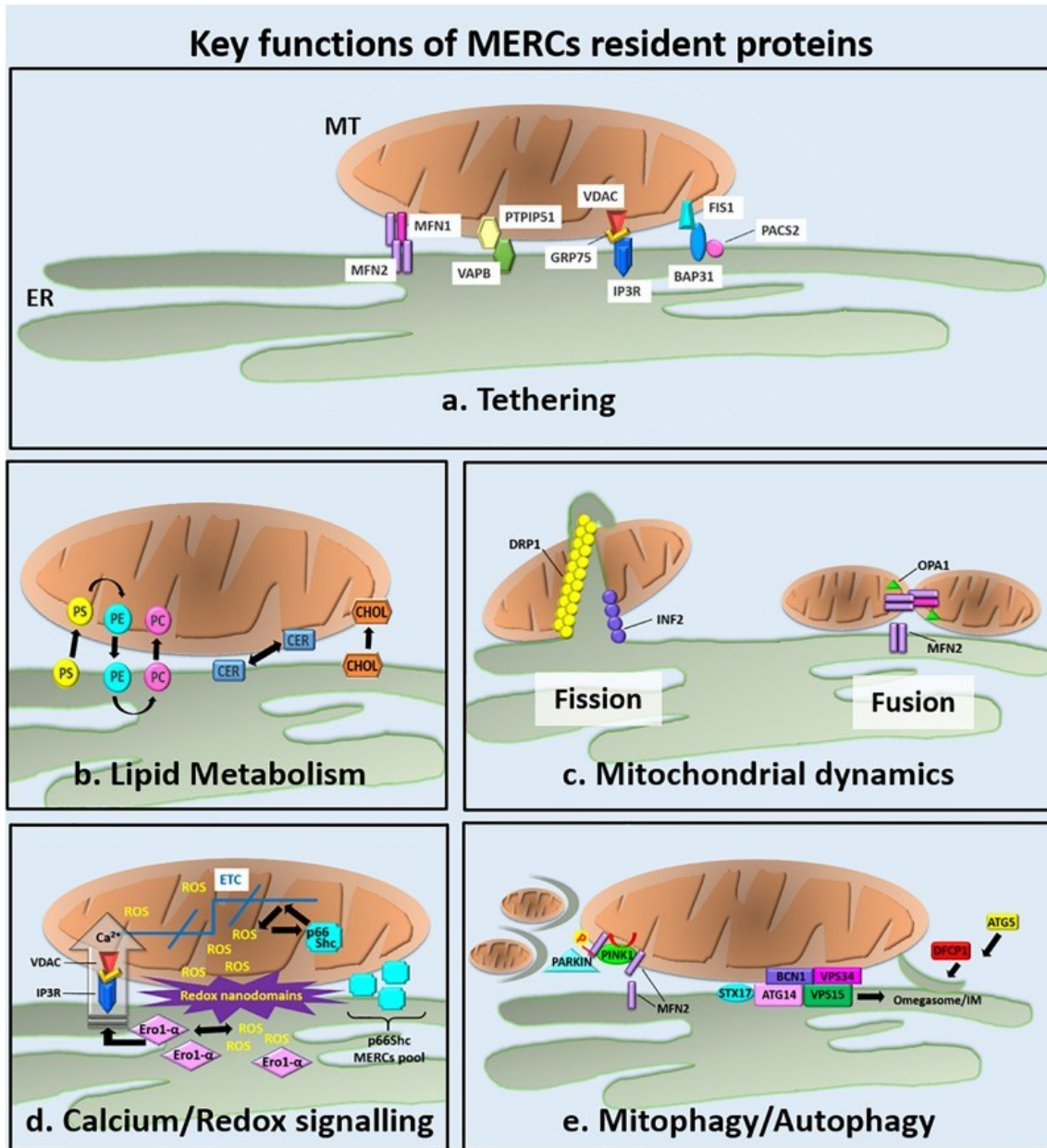


Figura 2.4 – schematizzazione delle principali funzioni dei siti dei MERCs⁴¹.

Tali evidenze hanno condotto a considerare i MERCs non solo come strutture di rilievo biologico, ma anche come promettenti bersagli terapeutici, aprendo nuove prospettive per la comprensione e il trattamento di diverse patologie tra cui la SLA⁴².

2.4 Componenti proteiche dei MERCs

Tra le proteine che contribuiscono al mantenimento di una corretta distanza tra ER e mitocondri vi è la mitofusina 2 (Mfn2). Si tratta di una proteina GTPasi localizzata sia sulla membrana mitocondriale esterna sia sulla superficie dell'ER, nota per il suo ruolo classico nella fusione delle membrane mitocondriali mediante interazioni omotipiche ed eterotipiche con Mfn1 ovvero la mitofusina 1, ma che svolge anche funzioni cruciali nel modulare i siti di contatto MERCs. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo articolato e talora contraddittorio di Mfn2 nella regolazione dell'architettura e della funzionalità delle MERCs: da un lato studi come quelli di Filadi et al. mostrano che l'eliminazione di Mfn2 non necessariamente riduce i contatti fisici ER-mitocondrio e può paradossalmente aumentare l'accoppiamento funzionale tra i due compartimenti, con un incremento del trasferimento di Ca^{2+} dall'ER al mitocondrio e conseguenti effetti sul metabolismo energetico e sull'omeostasi dello ione calcio⁴³; dall'altro, lavori in modelli animali riportati da Han et al. indicano che la perdita di Mfn2 provoca una marcata riduzione dei punti di apposizione ER-mitocondrio. L'assenza di Mfn2 interrompe le interazioni proteina-proteina che normalmente funzionano da tether tra le due membrane, determinando sia una diminuzione del numero di contatti che un accorciamento della loro lunghezza compromettendo così il trasferimento di Ca^{2+} e la capacità mitocondriale di rispondere alla segnalazione dello ione calcio, con ricadute funzionali sui neuroni quali diminuita respirazione mitocondriale, ridotta produzione di ATP e maggiore suscettibilità a stress ossidativo e apoptosi⁴⁴. Nel complesso questi dati ci suggeriscono che un controllo preciso dei livelli e dell'attività di Mfn2 è essenziale

per mantenere l'architettura e la funzionalità dei MERCs e, di conseguenza, la salute neuronale.

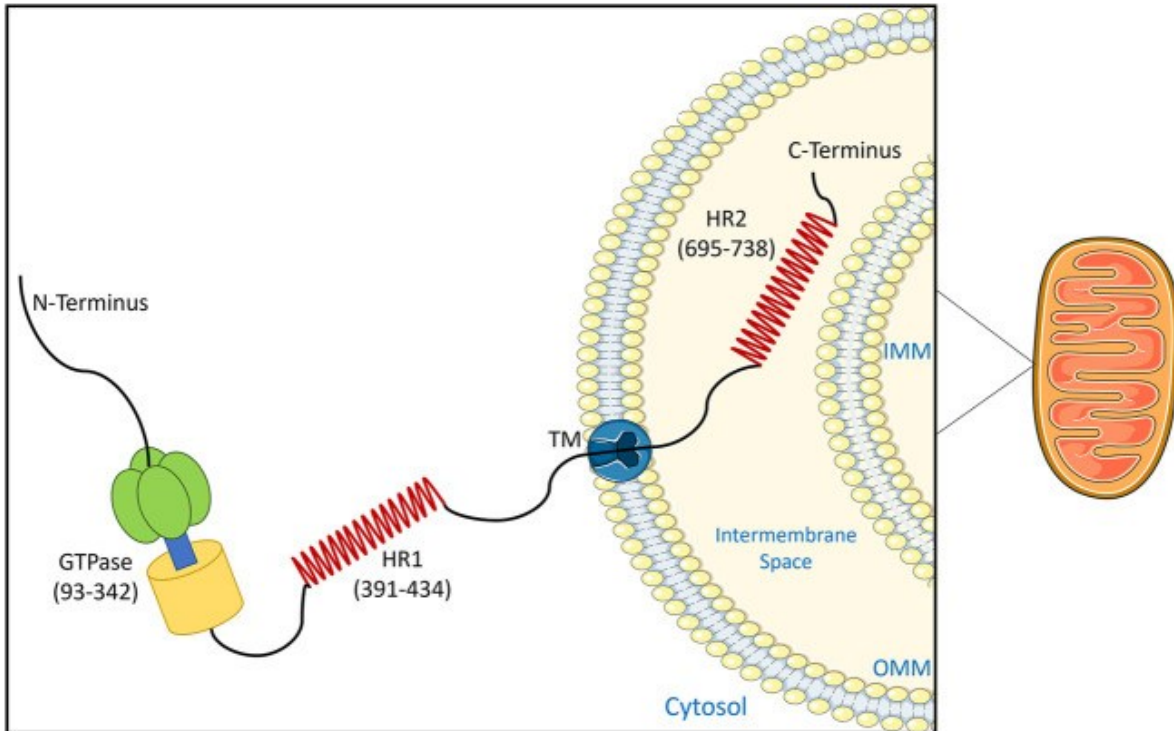


Figura 2.6 - Topologia di Mfn2. Questo schema illustra in modo dettagliato l'organizzazione dei domini funzionali e la struttura della proteina Mfn2 inserita nella membrana esterna mitocondriale, evidenziando le regioni transmembrana, i domini GTPasici, i segmenti citosolici e quelli orientati verso lo spazio intermembrana, nonché le aree coinvolte nell'ancoraggio ai siti di contatto con l'ER e nella regolazione della dinamica mitocondriale⁴⁵.

Un'altra proteina fondamentale coinvolta nei MERCs è la vescicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB). Si tratta di una proteina integrale di membrana dell'ER impegnata nel traffico di membrana e nell'organizzazione delle interazioni inter-organellari. La VAPB è in grado di interagire con un'altra proteina localizzata sulla membrana esterna del mitocondrio, la protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51 (PTPIP51), formando così un complesso che

funge da ponte strutturale e funzionale tra i due organelli. Studi sperimentali di De Vos et al. hanno pertanto evidenziato che VAPB e PTPIP51 formano un complesso di tethering molecolare che stabilizza i contatti MERCs e regola in maniera critica il trasferimento di Ca^{2+} e di conseguenza il metabolismo energetico. La perdita di uno dei due componenti riduce quindi in maniera significativa l'efficienza del trasferimento di Ca^{2+} dall'ER al mitocondrio, sottolineando il ruolo cruciale di questo complesso nel mantenimento dell'omeostasi ionica cellulare⁴⁶. Inoltre, l'alterazione di VAPB o di PTPIP51 influenza non solo l'omeostasi del Ca^{2+} , ma anche la regolazione dei processi autofagici. In cellule in cui l'espressione di VAPB o PTPIP51 è ridotta si osserva un aumento dell'autofagia basale, probabilmente conseguente a un decremento del trasferimento di Ca^{2+} verso i mitocondri con riduzione della produzione di ATP e attivazione di vie di stress energetico che favoriscono l'induzione dell'autofagia; alternativamente, la perdita del tethering può alterare la localizzazione e l'attività di regolatori chiave dell'autofagia a livello dei MERCs, rimuovendo un freno fisiologico su questo processo. Questi dati suggeriscono che la modulazione del complesso VAPB–PTPIP51 ai MERCs rappresenti un nodo critico che integra segnali metabolici, regolazione dello ione calcio e di qualità proteica per determinare la soglia di attivazione dell'autofagia, con potenziali implicazioni patogenetiche nelle malattie neurodegenerative come la SLA, dove disfunzioni dei contatti ER–mitocondrio possono contribuire a uno squilibrio tra sopravvivenza cellulare e degradazione autofagica⁴⁷. Di conseguenza, tali proteine risultano imprescindibili per assicurare il corretto svolgimento e la regolazione dei processi cellulari.

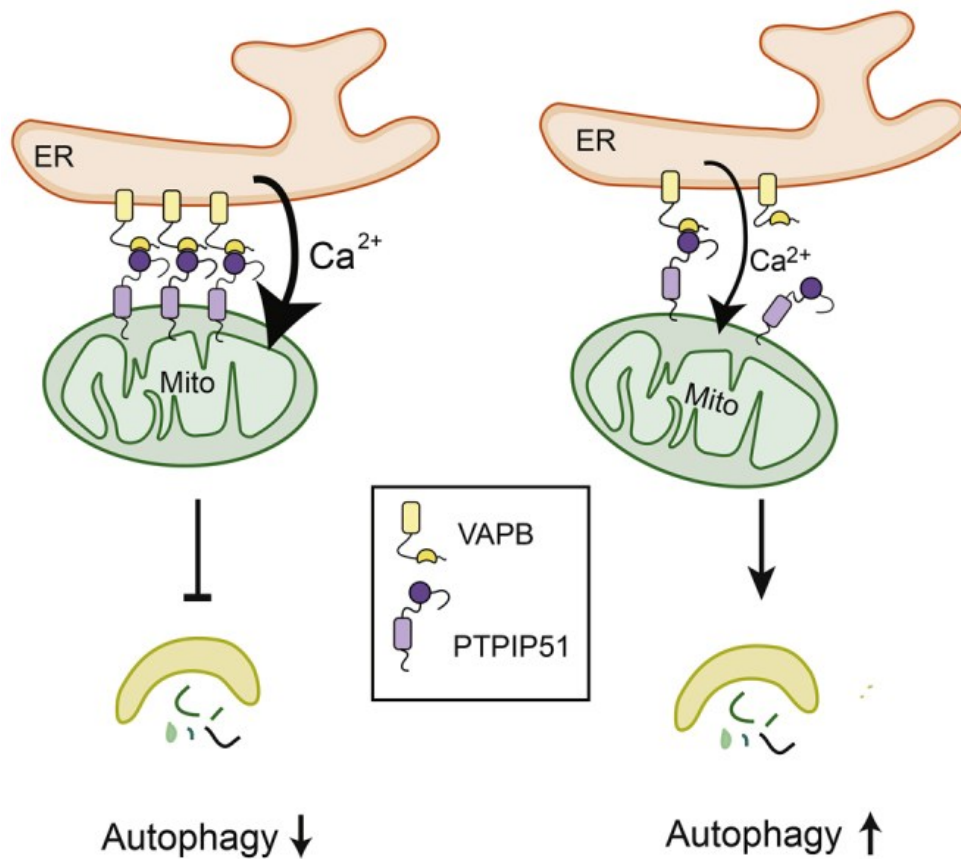


Figura 2.7 – Rappresentazione del complesso VAPB-PTPIP51 e del loro coinvolgimento nel processo di trasferimento di Ca^{2+} e nell'autofagia⁴⁷.

Un'altra coppia proteica con un ruolo importante nei MERCs è costituita da B-cell receptor associated protein 31 (Bap31) e da mitochondrial fission protein 1 (Fis1), che cooperano nel coordinare i processi di fissione mitocondriale e l'instradamento delle proteine verso la via apoptotica. La Bap31 è una proteina integrale della membrana dell'ER, coinvolta nel traffico delle proteine e nel controllo di qualità dell'ER, mentre Fis1 è localizzata sulla membrana esterna mitocondriale ed è essenziale per il reclutamento del macchinario di fissione e per la regolazione dell'omeostasi mitocondriale⁴⁸. Studi sperimentali hanno dimostrato che Fis1 e Bap31 interagiscono direttamente, formando un complesso molecolare localizzato a livello dei MERCs, il quale funge da ponte molecolare consentendo non solo

l'associazione fisica tra i due organelli ma anche la trasmissione di segnali biochimici, in particolare quelli connessi all'attivazione delle caspasi nel contesto dell'apoptosi⁴⁹. La formazione del complesso Fis1–Bap31 promuove il reclutamento e l'attivazione di procaspasi-8 al sito di contatto ER–mitocondrio, creando così una piattaforma locale per l'innescò della cascata apoptotica. Iwasawa et al. hanno mostrato che questo complesso facilita la conversione di procaspasi-8 in caspasi-8 attiva, con conseguente attivazione delle caspasi effettrici e promozione di eventi mitocondriali pro-apoptotici quali la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale. Tale meccanismo sottolinea come i MERCs possano fungere da hub sensibili per la decisione cellulare tra sopravvivenza e morte, integrando segnali di stress ER con risposte mitocondriali⁴⁸. Nel contesto della SLA, un'alterata dinamica dei contatti ER–mitocondrio potrebbe contribuire a fenomeni di perdita di compattezza funzionale dei MERCs, amplificando segnali pro-degenerativi legati a stress proteico, disfunzione mitocondriale e disregolazione dello ione calcio^{48,49}.

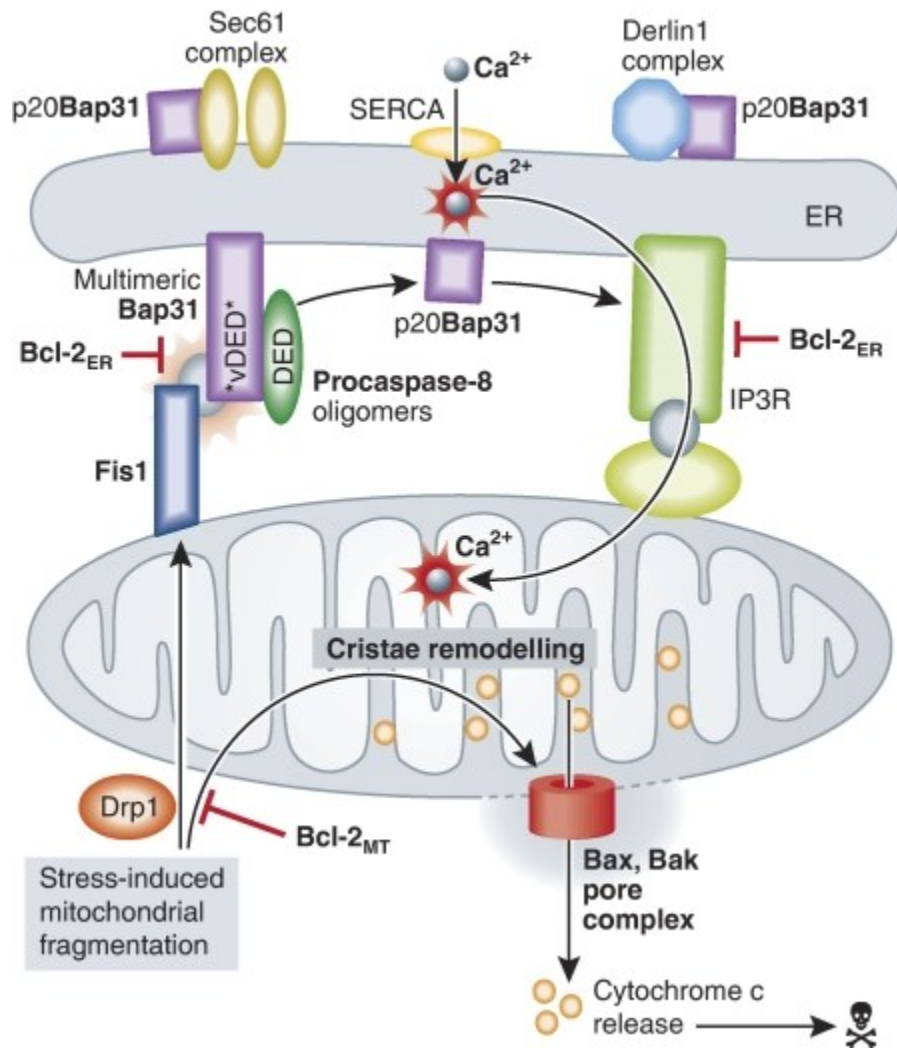


Figura 2.8 - È stato proposto un modello in cui la piattaforma Fis1/Bap31/procaspasi-8 contribuisce alla permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale. In questo contesto, l'attivazione della procaspasi-8 al livello dei MERCs favorisce l'innesco della cascata apoptotica extrinseca⁴⁸.

In sintesi, l'analisi delle principali proteine coinvolte nei MERCs evidenzia come questi siti di contatto costituiscano una piattaforma altamente specializzata in cui convergono processi di omeostasi del Ca²⁺, regolazione del metabolismo energetico, controllo della dinamica mitocondriale e modulazione delle vie di morte cellulare. Complessi come IP3R–GRP75–VDAC, VAPB–PTPIP51, Mitofusine, Bap31–Fis1 e DJ-1 sono fondamentali per le risposte alle interfacce ER-mitocondrio.

Le evidenze riportate suggeriscono che anche alterazioni relativamente circoscritte di tali complessi possano tradursi in profonde disfunzioni neuronali, fornendo un solido razionale per investigare, nei capitoli successivi, il contributo specifico di questi moduli proteici alla patogenesi della SLA.

2.5 Panoramica delle metodologie di studio dei MERCs

La crescente identificazione di proteine coinvolte nei MERCs ha permesso di delineare in maniera più precisa l'architettura di questi siti di contatto. Tuttavia, tali strutture sono dinamiche, transitorie e submicroscopiche. Questo rende particolarmente difficile la loro caratterizzazione sperimentale; di conseguenza, molte delle attuali conoscenze derivano dall'uso integrato di approcci ultrastrutturali, biochimici e di microscopia avanzata⁵⁰.

La microscopia elettronica (EM) rappresenta il metodo di riferimento per l'identificazione ultrastrutturale dei MERCs, consentendo di visualizzare direttamente i punti di contatto tra ER e mitocondri con elevata risoluzione spaziale. Essa permette di quantificare la distanza tra le due membrane, la lunghezza dei segmenti di contatto e la loro distribuzione all'interno della cellula, fornendo dati morfometrici fondamentali per correlare le alterazioni strutturali dei MERCs con i diversi stati fisiopatologici osservati. Nonostante l'elevata risoluzione spaziale, la tecnica presenta alcune limitazioni, tra cui la natura statica dell'osservazione, la necessità di fissazione e processazione del campione che può introdurre artefatti e l'impossibilità di monitorare in tempo reale la dinamica dei contatti ER-mitocondrio; e le tecniche di imaging fluorescente live sono spesso integrate per ottenere informazioni tridimensionali e dinamiche⁵¹.

Per lo studio della distribuzione proteica e delle interazioni molecolari nei MERCs sono state ampiamente utilizzate tecniche di microscopia a fluorescenza, inclusa la microscopia confocale e le metodiche di super-risoluzione. In particolare, la

microscopia confocale e le tecniche di imaging in vitro su cellule che esprimono sonde fluorescenti e dirette specificamente ai due compartimenti mitocondri ed ER hanno permesso di monitorare la formazione, la dinamica e la plasticità dei contatti in tempo reale. Parallelamente, l'uso di immunofluorescenza su cellule fissate ha facilitato la mappatura spaziale di proteine endogene coinvolte nei MERCs e l'identificazione di complessi proteici localizzati alle interfacce membranose. Complessivamente, come discusso da Scorrano et al., l'adozione di una combinazione di approcci di microscopia a fluorescenza e metodi ad alta risoluzione ha contribuito in modo sostanziale a definire l'eterogeneità strutturale e funzionale dei siti di contatto e a identificare i principali attori molecolari coinvolti⁵⁰.

Un'ulteriore metodologia per lo studio dei MERCs è rappresentata dalla tecnica di Proximity Ligation Assay (PLA), che, sfruttando anticorpi diretti contro due componenti del sito di contatto localizzate su membrane opposte, consente di ottenere dati quantitativi. Ciò risulta particolarmente vantaggioso per analizzare le modificazioni che emergono in seguito a perturbazioni di natura genetica o ambientale, offrendo una caratterizzazione sulla densità dei MERCs⁵⁰.

Un altro metodo per studiare i MERCs è il frazionamento biochimico mediante centrifugazione. Si omogeneizza il tessuto e si esegue una centrifugazione differenziale per rimuovere nuclei e detriti e ottenere frazioni subcellulari; poi si può usare un gradiente (saccarosio, Percoll o iodixanol/OptiPrep) per separare meglio mitocondri, ER e i contatti MERCs. Per isolare i MERCs si ottiene prima una frazione mitocondriale "cruda" separata dai microsomi, si purificano i mitocondri e si ricava una frazione intermedia arricchita in MERCs tramite gradiente. Parametri importanti sono velocità e tempi di centrifugazione, la composizione osmotica del buffer e le condizioni di omogeneizzazione per non rompere i contatti membrana-membrana. Le frazioni si caratterizzano con marker proteici (western blot: VDAC, TOM20, citocromo c per i mitocondri; calnexina, BiP/GRP78 per l'ER; FACL4/ACSL4, Sigma-1R, IP3R e proteine di contatto come GRP75, VAPB, PTPIP51 per i MERCs), saggi enzimatici (es. attività della citrate synthase) e controlli di purezza; spesso si aggiungono analisi proteomiche e lipidomiche. Funzionalmente, le frazioni isolate

permettono saggi sul Ca^{2+} (uptake mitocondriale con sonde fluorescenti, rilascio mediato da IP3, capacità tampone delle MERCs), test sul metabolismo energetico (respirazione mitocondriale, potenziale di membrana) e misure di ROS e apoptosi. Metodi complementari come EM, PLA e imaging con sonde FRET o sensori dello ione calcio aiutano a confermare i risultati. Nei modelli di neurodegenerazione, Lim et al. riportano che alterazioni delle proteine di tethering (es. Mfn2, VAPB-PTPIP51, complesso IP3R-GRP75-VDAC) e della composizione lipidica dei MERCs modificano il trasferimento di Ca^{2+} dall'ER al mitocondrio: troppo trasferimento causa sovraccarico mitocondriale, aumento di ROS, disfunzione respiratoria e morte cellulare; troppo poco trasferimento compromette la bioenergetica neuronale e la segnalazione dipendente dal Ca^{2+} . Questi approcci integrati (frazionamento biochimico + marker molecolari + saggi funzionali + imaging ultrastrutturale) permettono di collegare la distribuzione dei componenti del metabolismo del Ca^{2+} alla loro localizzazione subcellulare e di studiare meccanismi nelle malattie neurodegenerative.³⁵

Capitolo III

3.1 Alterazioni dei MERCs nelle malattie neurodegenerative

Come indicato nei capitoli precedenti le MERCs sono punti di contatto dinamici che favoriscono lo scambio di segnali e metaboliti (Ca^{2+} , lipidi, intermedi energetici) necessari per l'omeostasi cellulare. Questi siti modulano la risposta allo stress e la regolazione della morte cellulare, risultando rilevanti nei meccanismi che contribuiscono alla neurodegenerazione.

La disfunzione dei MERCs è stata ampiamente documentata in diverse malattie neurodegenerative, tra cui la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la SLA. In questi contesti patologici, i MERCs risultano spesso alterati in termini di estensione, composizione proteica e capacità di mediare lo scambio di Ca^{2+} e lipidi, con conseguenze dirette sul metabolismo energetico mitocondriale e sulla sopravvivenza neuronale⁵². Queste osservazioni generali sui MERCs forniscono un quadro utile per comprendere perché, nella SLA, la disfunzione di tali siti di contatto possa avere un impatto particolarmente grave. La SLA rappresenta una patologia neurodegenerativa progressiva caratterizzata principalmente dalla degenerazione selettiva degli MN, suggerendo l'esistenza di fattori intrinseci che rendono particolarmente vulnerabili queste cellule rispetto ad altri tipi neuronali. Tale vulnerabilità sembra derivare da una peculiare combinazione di caratteristiche morfo-funzionali, tra cui l'elevata lunghezza dell'assone, il fabbisogno energetico estremamente alto e la complessa regolazione dell'omeostasi calcio-mitocondriale. Queste caratteristiche, nel loro insieme, rendono gli MN particolarmente suscettibili a perturbazioni della funzione mitocondriale e della comunicazione con l'ER, con conseguente compromissione dei processi di proteostasi, del trasporto assonale e della sopravvivenza neuronale⁵³.

Nei neuroni, e in particolare negli MN, la funzionalità dei MERCs risulta cruciale per il mantenimento dell'omeostasi calcio-mitocondriale e per la regolazione del

metabolismo energetico, in ragione dell'elevata richiesta di energia e della particolare vulnerabilità di queste cellule allo stress ossidativo. In condizioni fisiologiche, infatti, i MERCs consentono il trasferimento diretto di Ca^{2+} dall'ER al mitocondrio attraverso il complesso proteico IP3R-GRP75-VDAC. Questo trasferimento è fondamentale per l'attivazione di enzimi del ciclo di Krebs e supportare la produzione di ATP, nonché per regolare l'attivazione di vie apoptotiche e la qualità mitocondriale⁵⁴. Numerosi studi, in particolare, indicano che le alterazioni dei MERCs possano costituire punti di convergenza tra diversi meccanismi patogenetici apparentemente distinti, tra cui la disfunzione mitocondriale e la compromissione dei processi autofagici⁵⁵.

Nel complesso, queste evidenze suggeriscono che la combinazione di elevata richiesta energetica, ridotta capacità di controllo del Ca^{2+} e vulnerabilità intrinseca ai processi di stress ossidativo rappresenti un terreno favorevole all'innescarsi di meccanismi neurodegenerativi e pertanto i MERCs appaiono come nodi critici.

3.2 Evidenze sperimentali del coinvolgimento dei MERCs nella SLA

Nel contesto della SLA, un numero crescente di studi sperimentali ha iniziato a indagare in modo diretto il ruolo dei MERCs, fornendo evidenze a supporto dell'ipotesi che alterazioni quantitative e qualitative di queste interfacce contribuiscano in maniera significativa alla degenerazione degli MN.

In questo capitolo verranno analizzate in modo sistematico le principali evidenze sperimentali che documentano alterazioni dei MERCs nella SLA, con l'obiettivo di integrare dati provenienti da sistemi in vitro e modelli murini. Verranno dapprima esaminate le modificazioni strutturali e funzionali dei siti di contatto ER-mitocondrio osservate in modelli genetici di SLA, come quelli basati su mutazioni di SOD1, TDP-

43 e FUS, con particolare attenzione alle conseguenze su omeostasi del Ca^{2+} , metabolismo lipidico e dinamica mitocondriale.

Nel complesso, l'analisi delle evidenze sperimentali disponibili consentirà di delineare il contributo delle alterazioni MERCs nei principali meccanismi patogenetici della SLA, fornendo una base razionale per la compressione del loro potenziale ruolo come bersagli terapeutici.

3.2.1 Modelli cellulari di SLA e alterazioni dei MERCs

L'impiego di modelli cellulari costituisce una delle strategie fondamentali per indagare i meccanismi molecolari alla base della SLA e, in particolare, per valutare in che modo le interazioni tra ER e mitocondri risultino compromesse nella patologia. Questi modelli sperimentali permettono di osservare direttamente alterazioni strutturali e funzionali a carico dei MERCs in cellule geneticamente modificate oppure derivate da pazienti o in cellule che esprimono proteine mutate associate alla SLA fornendo un collegamento sperimentale tra le osservazioni di laboratorio e i processi patogenetici della malattia.

Nei modelli cellulari di SLA, uno degli eventi ricorrenti è la disfunzione dei MERCs, mediata dall'alterazione delle interazioni tra specifiche proteine di tethering, in particolare VAPB localizzata a livello dell'ER, e PTPIP51 principalmente associata alla membrana mitocondriale esterna. Queste due proteine formano un complesso fisico che funge da ponte strutturale tra ER e mitocondri, mantenendo una corretta vicinanza e organizzazione spaziale tra i due organelli. In questo modo, il complesso VAPB-PTPIP51 regola in maniera fine il trasferimento di Ca^{2+} dall'ER alla matrice mitocondriale, modulando così la bioenergetica mitocondriale e la produzione di ATP, oltre a influenzare il metabolismo lipidico e la dinamica mitocondriale. Nella SLA, mutazioni o alterazioni di espressione di VAPB, così come cambiamenti nella funzione di PTPIP51, compromettono questo asse di tethering, determinando una

ridotta o aberrante comunicazione ER–mitocondrio, con conseguente squilibrio del Ca^{2+} intracellulare, difetti metabolici, stress mitocondriale e, in ultima analisi, vulnerabilità neuronale⁵⁶.

In un altro studio sperimentale, condotto utilizzando linee cellulari transdotte per esprimere specifiche mutazioni associate alla SLA, come quelle localizzate nel gene C9orf72, è stato dimostrato in modo convincente che la tossicità derivante dalle espansioni dell'esanucleotide GGGGCC induce un marcato disaccoppiamento delle interazioni tra VAPB-PTPIP51 con conseguente riduzione significativa del numero e/o dell'estensione dei contatti funzionali tra ER e mitocondri. Questo fenomeno è stato osservato non solo in neuroni derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) di pazienti portatori delle espansioni in C9orf72, nei quali si rilevano alterazioni precoci dell'architettura dei MERCs, ma anche in neuroni ottenuti da modelli murini transgenici che esprimono la stessa mutazione, nei quali la perdita progressiva dell'integrità di questi tethers precede temporalmente l'insorgenza dei sintomi motori e la comparsa di degenerazione assonale. Tali risultati suggeriscono che il perturbamento precoce dei MERCs non rappresenti un semplice fenomeno secondario della neurodegenerazione, ma costituisca verosimilmente un evento patogenetico iniziale nella cascata neurodegenerativa tipica della SLA⁵⁷.

Oltre alle espansioni di C9orf72, sono state descritte alterazioni a carico di altre proteine implicate nella SLA. Infatti alterazioni di TDP-43 e FUS sono state correlate alla disfunzione dei MERCs. In particolare, l'espressione di forme alterate di TDP-43 in modelli cellulari è associata a una ridotta interazione VAPB-PTPIP51, con conseguente incremento dell'attività di GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β), una chinasi coinvolta in molteplici vie di segnalazione cellulare, tra cui quelle che regolano la sopravvivenza neuronale e la risposta allo stress. L'aumentata attività di GSK3 β contribuisce a destabilizzare ulteriormente i contatti MERCs, favorendone il distacco e riducendo la superficie di interazione tra ER e mitocondri. Questo rimodellamento patologico dei MERCs compromette in modo significativo il trasferimento di Ca^{2+} dall'ER ai mitocondri, un processo essenziale per il corretto funzionamento della catena respiratoria e per la regolazione della produzione di

ATP. Di conseguenza, la capacità dei mitocondri di sostenere il fabbisogno energetico del MN risulta ridotta, con una diminuzione della sintesi di ATP. Parallelamente, l'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale e il deficit energetico favoriscono un aumento della produzione di ROS e un marcato incremento dello stress ossidativo, che a loro volta promuovono danno mitocondriale, disfunzione sinaptica e, infine, degenerazione degli MN⁵⁷.

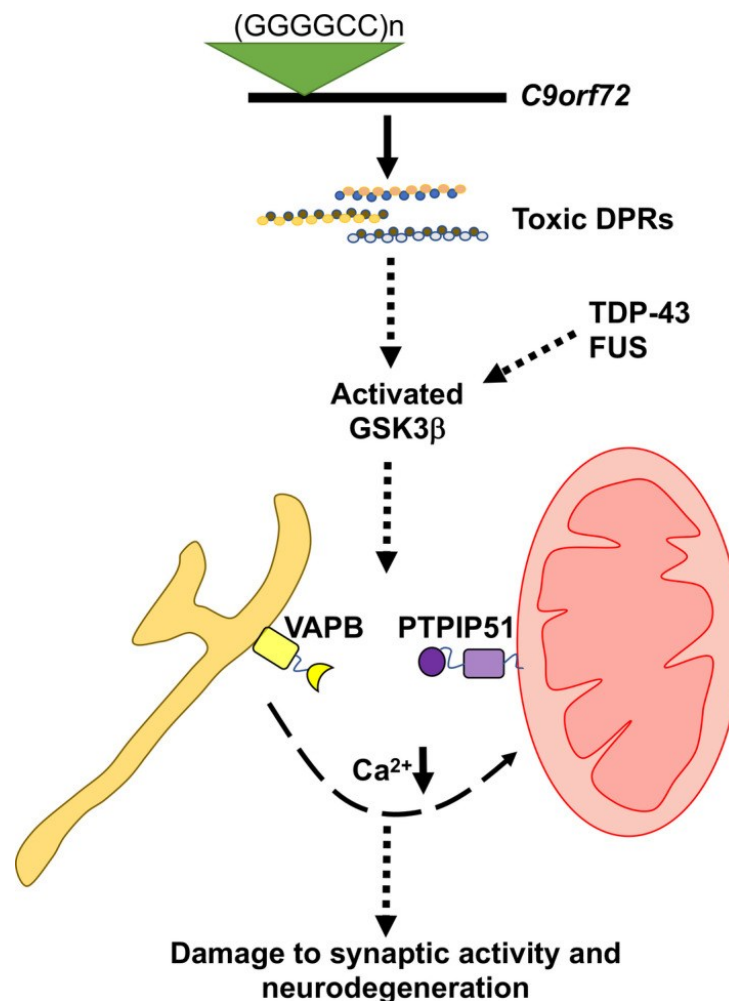


Figura 3.1 – L'immagine mostra come le espansioni patologiche di C9orf72, le mutazioni TDP-43 e FUS compromettano i MERCs attraverso l'attivazione di GSK3β che causa una riduzione dell'interazione tra le proteine tethering VAPB e PTPIP51, con conseguente alterazione del trasferimento dello ione calcio⁵⁷.

Tali modelli evidenziano come differenti mutazioni genetiche associate alla SLA convergano nel determinare un medesimo danno strutturale e funzionale a carico dei MERCs.

Oltre a queste funzioni, i MERCs svolgono un ruolo cruciale anche nel coordinamento di processi omeostatici quali autofagia selettiva e mitofagia, controllando il riconoscimento e l'eliminazione di mitocondri danneggiati mediante il reclutamento di complessi proteici chiave e il trasferimento locale di segnali lipidici. Studi recenti evidenziano che, nei modelli cellulari e neuronali con mutazioni in TDP-43 e nella ripetizione espansa di C9orf72, l'organizzazione strutturale e funzionale dei punti di contatto ER-mitocondrio è alterata: si osserva una ridotta apposizione tra le membrane, dislocazione di proteine ancoranti dei MERCs e difetti nel trasferimento di Ca^{2+} e lipidi. Queste disfunzioni compromettono l'attivazione della via di mitofagia favorendo l'accumulo di mitocondri con membrane depolarizzate, aumento della produzione di ROS e perdita di capacità bioenergetica. Parallelamente, la compromissione dei MERCs interferisce con la biogenesi dei lipidi e la funzione dell'ER, amplificando lo stress proteico e l'attivazione della risposta allo stress del reticolo (UPR), fenomeni che sono stati collegati all'esacerbazione del fenotipo degenerativo negli MN. Nel complesso, le evidenze riportate da Dafinca et al. suggeriscono che la perturbazione dei MERCs nelle forme legate a TDP-43 e C9orf72 contribuisce in modo sostanziale all'accumulo di mitocondri difettosi, all'aumento dello stress intracellulare e all'accelerazione dell'insorgenza di fenotipi patologici tipici della SLA, proponendo i MERCs come potenziali nodi patogenetici e bersagli terapeutici⁵⁸. Ciò suggerisce che le alterazioni dei MERCs non siano solo un effetto secondario dello stress cellulare, ma possono agire come contributi primari alla degenerazione cellulare.

3.2.2 Modelli animali di SLA e alterazioni dei MERCs

I modelli animali di SLA rappresentano uno strumento essenziale per lo studio dei meccanismi patogenetici della malattia. In particolare, i modelli murini transgenici hanno fornito evidenze fondamentali del ruolo dei MERCs nella degenerazione degli MN. Tali risultati sperimentali hanno quindi rafforzato l'ipotesi che i MERCs rappresentino un hub critico nella patogenesi della SLA e costituiscano un potenziale bersaglio per future strategie terapeutiche.

Tra i modelli animali più rilevanti per lo studio dei contatti ER-mitocondrio nella SLA rivestono un ruolo centrale i topi transgenici portatori di espansioni patologiche del gene C9orf72, attualmente riconosciuta come la più comune causa genetica sia di SLA sia di FTD. Questi modelli murini consentono di riprodurre in vivo molteplici aspetti della patologia umana, inclusi deficit sinaptici precoci, alterazioni della funzione mitocondriale⁵⁸.

Studi condotti su tali modelli hanno dimostrato che le espansioni di C9orf72 inducono una disregolazione precoce dei contatti MERCs, osservabile già in fasi presintomatiche della malattia, suggerendo che il rimodellamento patologico dei punti di contatto tra ER e mitocondrio possa rappresentare un evento iniziale nella cascata patogenetica. In particolare, nello studio condotto è stata evidenziata una riduzione significativa dell'interazione tra le proteine di tethering VAPB e PTPIP51 nel midollo spinale e nella corteccia di topi C9orf72, rispetto ai controlli wild-type. Tale riduzione dei complessi VAPB-PTPIP51 si associa a una compromissione della segnalazione ER-mitocondrio, con conseguente alterazione del trasferimento di Ca^{2+} dai depositi dell'ER ai mitocondri. Questo difetto nel flusso di Ca^{2+} verso i mitocondri determina un'inefficiente attivazione degli enzimi della fosforilazione ossidativa, contribuendo a deficit energetici, aumento dello stress ossidativo e vulnerabilità degli MN a stimoli eccitotossici. Nel loro insieme, queste evidenze supportano l'ipotesi che le espansioni di C9orf72, attraverso la perturbazione dei MERCs mediata dalla disaggregazione dell'asse VAPB-PTPIP51, possano favorire l'instaurarsi di un ambiente cellulare sfavorevole alla sopravvivenza neuronale, rappresentando così un nodo chiave nella patogenesi della SLA legata a C9orf72⁵⁸.

Inoltre, l'espressione, in diversi modelli animali e in sistemi cellulari sperimentali, delle dipeptide repeat proteins (DPR) generate tramite RAN translation delle espansioni esanucleotidiche nel gene C9orf72, in particolare delle forme considerate maggiormente tossiche, quali poly-GR e poly-PR, è stata associata non solo a un'alterazione diretta dell'architettura e della funzionalità dei MERCs, ma anche all'attivazione aberrante della chinasi GSK3 β . Quest'ultima, mediante la fosforilazione disfunzionale di diversi target chiave coinvolti nell'omeostasi mitocondriale e nella regolazione del Ca²⁺, contribuisce a compromettere in modo sostanziale la comunicazione ER-mitocondrio e a interferire con l'attivazione di vie pro-sopravvivenza neuronale. Nel complesso, tali alterazioni convergono nel favorire condizioni di stress mitocondriale cronico, sbilanciamento tra segnali pro- e anti-apoptotici e aumentata vulnerabilità degli MN, rappresentando un possibile meccanismo patogenetico centrale nel contesto della SLA associata a mutazioni di C9orf72⁵⁷.

Oltre ai modelli C9orf72, anche i modelli basati su TDP-43 e FUS hanno fornito importanti informazioni sul ruolo dei MERCs nella patogenesi della SLA. In particolare, in modelli murini che sovraesprimono TDP-43 mutata è stata osservata una marcata riduzione strutturale dei contatti ER-mitocondrio. Questa riduzione è stata quantificata mediante EM e risulta associata a una disorganizzazione del complesso VAPB-PTPIP51, considerato un nodo molecolare chiave nel mantenimento dei MERCs. Tale disaccoppiamento si traduce in un'alterata trasmissione dei segnali di Ca²⁺ dall'ER ai mitocondri, con conseguente compromissione della fosforilazione ossidativa, aumento dello stress ossidativo e maggiore vulnerabilità delle cellule neuronali a stimoli eccitotossici. Queste evidenze suggeriscono che TDP-43 mutata contribuisca alla neurodegenerazione non solo attraverso la formazione di aggregati proteici e la disfunzione della proteostasi, ma anche mediante una perturbazione diretta dei punti di contatto ER-mitocondrio e dei loro complessi di tethering⁵⁹.

I medesimi meccanismi sono stati osservati nei modelli murini di FUS associato a SLA/FTD. Dagli studi è emerso che sia l'espressione di FUS wild-type sia di varianti

mutanti nei topi transgenici causa una disgregazione delle associazioni ER-mitocondrio, simile a quella osservata per TDP-43, con conseguente alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} , della bioenergetica mitocondriale e della sopravvivenza neuronale. In questi modelli, FUS attiva in maniera aberrante la chinasi GSK3 β , che a sua volta riduce la capacità di VAPB di legarsi a PTPIP51, indebolendo fisicamente i punti di contatto MERCs e compromettendo lo scambio di segnali e metaboliti tra i due organelli. Il lavoro di Stoica e colleghi dimostra inoltre che l'inibizione farmacologica o genetica di GSK3 β è in grado di ripristinare parzialmente l'interazione VAPB-PTPIP51 e le associazioni ER-mitocondrio, suggerendo che l'asse FUS-GSK3 β -VAPB/PTPIP51 rappresenti un nodo critico attraverso cui le mutazioni di FUS contribuiscono alla disfunzione dei MERCs e alla neurodegenerazione nei modelli di SLA/FTD⁶⁰.

Dal punto di vista neuropatologico, queste disfunzioni dei MERCs precedono spesso la perdita neuronale visibile e l'insorgenza dei sintomi motori nei modelli animali, suggerendo anche in questo caso che la perturbazione dell'asse ER-mitocondriale sia quindi un evento precoce nella cascata patogenetica della SLA associata a TDP-43 e FUS. Inoltre, la presenza di aggregati TDP-43 e FUS negli MN dei topi transgenici riflette la fisiopatologia della SLA umana, rendendo questi modelli particolarmente rilevanti per studiare il ruolo dei MERCs nelle fasi iniziali della malattia e per identificare potenziali bersagli terapeutici⁵⁹.

Nel loro insieme, i dati ottenuti dai modelli animali confermano e ampliano in modo significativo quanto osservato nei sistemi cellulari, dimostrando che la compromissione dei MERCs non rappresenta un semplice fenomeno secondario, ma costituisce un evento strettamente e progressivamente associato alle diverse fasi di sviluppo e aggravamento della SLA.

Queste osservazioni supportano in modo robusto l'ipotesi che il ripristino, la modulazione o il potenziamento della funzionalità dei contatti ER-mitocondrio possa rappresentare una strategia terapeutica promettente per rallentare la progressione della neurodegenerazione o modularne la severità.

3.3 Meccanismi molecolari alla base della disfunzione dei MERCs nella SLA

Le evidenze sperimentali recenti indicano che le alterazioni dei MERCs rappresentano un nodo patogenetico centrale nella SLA; infatti, la loro disfunzione crea un microambiente intracellulare sfavorevole che compromette il ruolo di hub di comunicazione ER-mitocondrio, contribuendo in modo determinante all'evoluzione e alla progressione della patologia negli MN.

Uno dei ruoli maggiormente studiati dei MERCs è la mediazione del trasferimento di Ca^{2+} dall'ER ai mitocondri attraverso complessi multiproteici IP3R-GRP75-VDAC. Questo flusso di Ca^{2+} è essenziale per sostenere l'attività degli enzimi mitocondriali del ciclo di Krebs. Infatti un adeguato trasferimento di Ca^{2+} ai mitocondri consente di adattare la produzione energetica alle richieste funzionali del neurone. Nei modelli cellulari e animali di SLA, le alterazioni quantitative (numero e estensione dei contatti) e qualitative (composizione e organizzazione dei complessi proteici) dei MERCs determinano una riduzione del trasferimento del Ca^{2+} ai mitocondri, con conseguente accumulo citosolico di Ca^{2+} , sovraccarico di vie di segnalazione calcio-dipendenti e compromissione della bioenergetica neuronale. Studi condotti su modelli associati a TDP-43, FUS e C9orf72 hanno dimostrato che la disregolazione di tali contatti è accompagnata da una diminuzione dell'assorbimento mitocondriale di Ca^{2+} , favorendo lo stress ossidativo, l'attivazione di vie pro-apoptotiche e una maggiore vulnerabilità neuronale. Quindi la perturbazione dei complessi di accoppiamento calcio-dipendenti ai MERCs rappresenta un nodo patogenetico cruciale nella SLA^{57,59}.

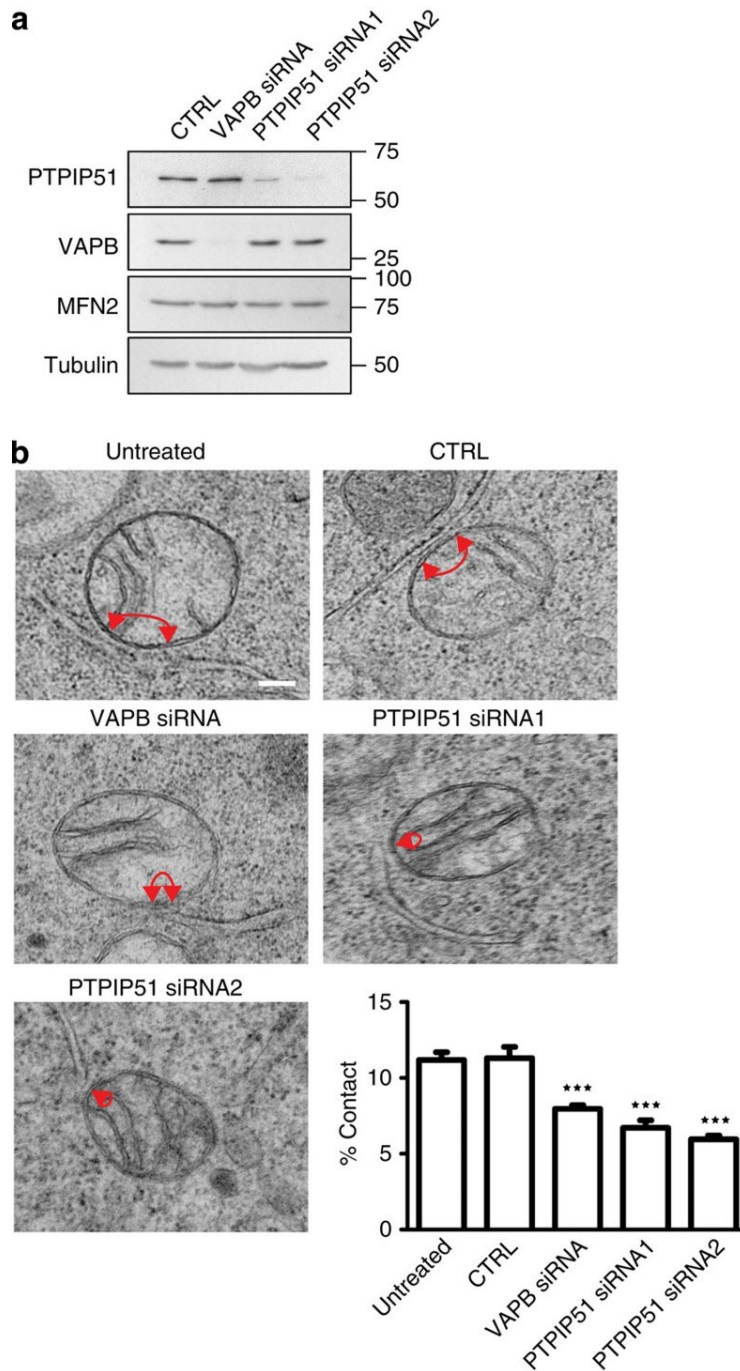


Figura 3.2 - la riduzione dell'espressione delle proteine di tethering VAPB e PTPIP51 determina un'alterazione dei contatti MERCs. il pannello **a** mostra la validazione del silenziamento genico mediante Western blot, mentre il pannello **b** evidenzia, tramite EM, un aumento della distanza tra le due membrane e una diminuzione dei siti di contatto (frecce rosse)⁵⁹.

Negli MN affetti da SLA, oltre ad alterazioni nell'omeostasi del Ca^{2+} , è possibile notare ampie evidenze di stress dell'ER e di attivazione dell'UPR, indicando un profondo coinvolgimento di questo organello nei processi patogenetici alla base della neurodegenerazione; inoltre tali processi sono strettamente interconnessi ai MERCs, contribuendo alla disfunzione cellulare osservata nella malattia.

L'ER rappresenta il sito principale di sintesi, modificazione post-traduzionale, corretto ripiegamento e assemblaggio delle proteine appena tradotte. In quanto organello delimitato da membrana, risulta particolarmente vulnerabile a cambiamenti nella struttura, nell'integrità e nella funzione, i quali possono compromettere l'omeostasi del ripiegamento proteico. Le proteine che non riescono a raggiungere la loro corretta conformazione terziaria vengono retrotraslocate nel citosol e avviate alla degradazione tramite il sistema ubiquitina-proteasoma. Quando si verifica un accumulo eccessivo di proteine non correttamente ripiegate o mal ripiegate, la capacità dell'ER di gestire il carico proteico viene superata, determinando una condizione di "stress dell'ER" che contribuisce all'insorgenza e alla progressione di diverse patologie. La UPR è il meccanismo che si attiva in risposta all'accumulo di proteine mal ripiegate. In condizioni fisiologiche, i sensori UPR quali PERK, IRE1 α (inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 α) e ATF6 sono mantenute inattive dall'associazione con BiP/GRP78 (78 KDa glucose-regulated protein). Quando l'ER è in una condizione di stress protratto, BiP si dissocia dai sensori, attiva le vie dell'URP che mirano a ripristinare l'omeostasi attraverso la riduzione della sintesi proteica globale e la degradazione di proteine mal ripiegate. Se questa condizione di stress non può essere risolta si può andare incontro all'attivazione di programmi pro-apoptotici e quindi alla morte cellulare⁶¹.

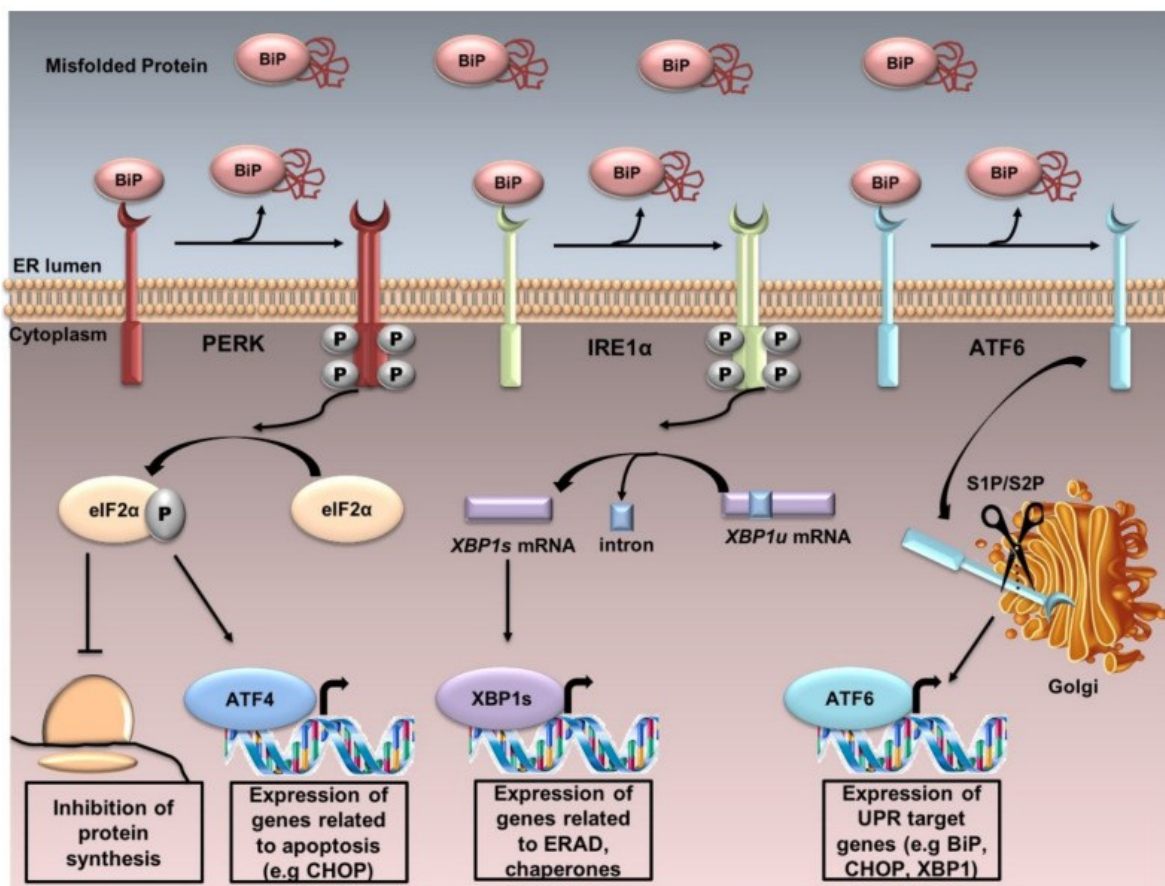


Figura 3.3 - Schema dei principali rami della UPR attivati in risposta allo stress dell'ER. In una prima fase si verifica il distacco di Bip/GRP78 dai sensori transmembrana PERK, IRE1 α e ATF6, evento che ne consente l'attivazione. In conseguenza di ciò si osservano una riduzione della sintesi proteica globale, l'attivazione di fattori pro-apoptotici quali CHOP, l'espressione dei geni coinvolti nella degradazione delle proteine mal ripiegate (ERAD) e la traslocazione di ATF6 all'apparato di Golgi, dove esso viene processato per indurre la trascrizione dei geni della UPR⁶¹.

Nella SLA, lo stress dell'ER è stato ampiamente documentato in numerosi modelli sperimentali, inclusi tessuti post-mortem reclutati da pazienti affetti da sALS e fALS, nonché in modelli murini genetici che esprimono forme mutate di SOD1, TDP-43 e VAPB. In tali sistemi sperimentali è stata osservata un'attivazione marcata della risposta allo stress del reticolo, con incremento dell'espressione di sensori di stress

e di proteine pro-apoptotiche, indicando il passaggio da una risposta inizialmente adattativa a una risposta maladattativa che contribuisce alla degenerazione degli MN⁶². È inoltre importante sottolineare che i MERCs stessi partecipano alla modulazione della URP, poiché alcune delle principali chinasi di stress del reticolo, come PERK e IRE1 α , risultano arricchite e funzionalmente attive proprio in prossimità di tali siti di contatto. Ciò suggerisce che la risposta al misfolding proteico non si limiti a un adattamento intraluminale dell'ER, ma coinvolga direttamente le interazioni strutturali e funzionali tra ER e mitocondrio. In neuroni altamente specializzati come gli MN, tale sbilanciamento tra risposta adattativa e risposta maladattativa della URP mediata dai MERCs può rappresentare un nodo critico nella progressione della degenerazione neuronale, contribuendo in maniera sostanziale alla vulnerabilità selettiva osservata nella SLA ⁶³.

Proseguendo nell'analisi dei meccanismi patogenetici, la disfunzione mitocondriale emerge come elemento centrale nella fisiopatologia della SLA ed è strettamente interconnessa alle alterazioni dei MERCs. Come già indicato in precedenza, i mitocondri svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi energetica neuronale, nella regolazione del Ca²⁺ intracellulare e nel controllo delle vie apoptotiche; pertanto, la compromissione della loro funzione risulta particolarmente dannosa negli MN, cellule altamente dipendenti da un efficiente metabolismo ossidativo⁶².

Numerosi studi sperimentali, condotti sia su tessuti post-mortem di pazienti affetti da SLA sia su modelli cellulari e animali, hanno messo in evidenza profonde alterazioni strutturali e funzionali dei mitocondri, includendo cambiamenti morfologici, diminuzione della numerosità e della distribuzione dei mitocondri, perdita del potenziale di membrana mitocondriale interna e un marcato deficit nella funzionalità della catena respiratoria mitocondriale e del trasporto degli elettroni. In particolare, sono stati descritti un'anomala distribuzione dei mitocondri lungo gli assoni, un'alterata dinamica di fusione e fissione mitocondriale e un incremento della produzione di ROS, che contribuiscono a danno ossidativo e disfunzione energetica negli MN. Le anomalie descritte rafforzano l'idea che il deficit funzionale dei

mitocondri sia un determinante chiave nella patogenesi della SLA e un possibile punto di intervento per approcci terapeutici mirati ⁶⁴.

Un ulteriore ruolo di rilievo attribuibile ai MERCs riguarda il processo di autofagia, ovvero un processo catabolico essenziale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare responsabile della degradazione lisosomiale di proteine aggregate e organelli danneggiati. A livello molecolare, i MERCs rappresentano un hub cruciale per l'inizio dell'autofagia, in quanto in queste microregioni di contatto si concentrano proteine chiave coinvolte nella nucleazione della membrana autofagosomale e nello scambio di lipidi necessari alla biogenesi degli autofagosomi, oltre a fattori che regolano il flusso di Ca^{2+} tra ER e mitocondri, con impatto diretto sul metabolismo energetico e sulla capacità della cellula di rispondere allo stress. Nei neuroni, e in particolare negli MN, l'autofagia svolge un ruolo cruciale data l'elevata richiesta metabolica, l'estensione del compartimento assonale e la limitata capacità rigenerativa di queste cellule, rendendo indispensabile un turnover efficiente di mitocondri e proteine sinaptiche danneggiate. Nella SLA, numerose evidenze indicano una disfunzione dei meccanismi autofagici, spesso associata ad alterazioni strutturali e funzionali delle MERCs, che contribuisce all'accumulo di aggregati proteici e mitocondri danneggiati, favorendo la progressione della neurodegenerazione attraverso l'amplificazione dello stress ossidativo, del deficit energetico e dell'attivazione di vie pro-apoptotiche⁶². La forma specializzata di autofagia a livello mitocondriale è la mitofagia, ovvero un processo dedicato alla rimozione selettiva dei mitocondri danneggiati o disfunzionali, essenziale per il mantenimento della qualità mitocondriale. Nei neuroni la mitofagia riveste un ruolo cruciale nel prevenire l'accumulo di ROS, la compromissione del potenziale di membrana mitocondriale e la conseguente perdita dell'omeostasi energetica. In questo contesto i MERCs emergono come piattaforme strutturali e funzionali fondamentali per l'integrazione dei segnali che regolano l'attivazione della mitofagia infatti alterazioni nella dinamica e nell'organizzazione di tali contatti possono tradursi in una compromessa eliminazione dei mitocondri difettosi, favorendo la vulnerabilità neuronale e contribuendo alla degenerazione osservata nello spettro SLA-FTD⁶⁵.

I MERCs rivestono pertanto un ruolo cruciale nelle fasi iniziali del processo autofagico, in particolare nell'innescare e nella formazione degli autofagosomi. Studi condotti su cellule di mammifero hanno dimostrato che i primi segni di formazione di autofagosomi si concentra preferenzialmente a livello della giunzione ER-mitocondrio in seguito a stimoli pro-autofagici; al contrario, quando tali contatti tra organelli vengono alterati, la biogenesi degli autofagosomi risulta marcatamente compromessa. Questo indica che i MERCs rappresentino un vero e proprio centro organizzativo per l'assemblaggio del fagoforo, fornendo una piattaforma spazialmente organizzata per il reclutamento dei componenti del complesso di nucleazione dell'autofagia e per il coordinamento dello scambio di lipidi e Ca^{2+} necessario all'espansione della membrana autofagosomale⁶⁶.

Le evidenze indicano quindi che i MERCs sono un nodo integrativo dove convergono disfunzione del Ca^{2+} , stress dell'ER, alterazioni mitocondriali e difetti di autofagia/mitofagia, costituendo un denominatore molecolare nella patogenesi della SLA. La perturbazione dei complessi di tethering (es. VAPB-PTPIP51, IP3R-GRP75-VDAC1) riduce il trasferimento di Ca^{2+} ai mitocondri, aggravando eccitotossicità, deficit energetico, stress ossidativo e proteostasi negli MN. Nel complesso, questi dati supportano il ruolo dei MERCs come potenziale bersaglio terapeutico per preservare l'integrità degli MN nella SLA.

Conclusioni e prospettive future

Alla luce di quanto esposto nei capitoli precedenti, risulta evidente come, negli ultimi decenni, i MERCs si siano affermati come piattaforme funzionali centrali nel mantenimento dell'omeostasi cellulare regolando processi chiave quali: trasferimento di Ca^{2+} , biosintesi lipidica, dinamica mitocondriale, risposta allo stress dell'ER e l'attivazione dei meccanismi autofagici. L'evidenza attualmente disponibile indica che una compromissione, sia quantitativa sia qualitativa, dei MERCs costituisce un punto in comune a numerose patologie neurodegenerative, inclusa la SLA. In questo contesto, alterazioni dei MERCs sono state osservate in modelli cellulari e animali di SLA, correlandosi con anomalie nel trasferimento di Ca^{2+} , stress ossidativo, deficit energetico e compromissione dei meccanismi di controllo della qualità mitocondriale^{67,68}. Questi cambiamenti sembrano essere particolarmente pronunciati negli MN, cellule estremamente dipendenti da un metabolismo energetico efficiente e da una precisa regolazione del Ca^{2+} per sostenere la funzione sinaptica, la capacità di generare e propagare potenziali d'azione ad alta frequenza e di mantenere l'integrità strutturale attraverso la lunga distanza degli assoni⁶⁹. In tale contesto, anche modeste perturbazioni nei MERCs, che coordinano lo scambio di Ca^{2+} e metaboliti tra ER e mitocondri, possono tradursi in un rapido declino della funzionalità neuronale e contribuire alla progressiva degenerazione tipica della SLA.

Il riconoscimento dei MERCs come hub funzionali integrativi ha portato all'ipotesi che queste strutture possano costituire bersagli farmacologici innovativi per il trattamento delle malattie neurodegenerative, inclusa la SLA. Tradizionalmente, la farmacologia nelle malattie neurodegenerative si è concentrata su singole proteine mutate o su vie specifiche; tuttavia, data la natura multifattoriale della SLA, un approccio che moduli i MERCs potrebbe permettere di agire simultaneamente su più processi citotossici. In questo contesto, gli screening genetici descritti da Wilson e Metzakopian hanno messo in evidenza come l'alterazione di specifici componenti dei siti di contatto ER-mitocondrio possa modulare la vulnerabilità neuronale, lo

stress ossidativo e l'omeostasi del Ca^{2+} , suggerendo che la manipolazione mirata di tali nodi di contatto possa rimodellare reti patogenetiche complesse piuttosto che singoli pathway. L'identificazione di geni e vie che regolano la formazione, la stabilità e la funzione dei MERCs apre infatti alla possibilità di sviluppare molecole in grado di rafforzare o, al contrario, allentare selettivamente questi contatti, in funzione del contesto patologico. In prospettiva, l'integrazione di approcci di screening genetico su larga scala con piattaforme farmacologiche ad alta capacità potrebbe consentire di costruire una mappa funzionale dei MERCs nella SLA, accelerando l'individuazione di composti capaci di ripristinare un equilibrio dinamico tra ER e mitocondri negli MN⁶⁸.

Uno dei filoni di ricerca più promettenti riguarda lo sviluppo di piccole molecole in grado di modulare la formazione e la funzione dei MERCs. Gli studi condotti finora su modelli cellulari e pre-clinici mostrano che è possibile identificare composti capaci di aumentare i siti di contatto tra ER e mitocondri, migliorando il trasferimento di Ca^{2+} e favorendo la bioenergetica cellulare. In particolare, nel modello di SLA analizzato da Etxebeste-Mitxelorena e colleghi, l'alterazione dei MERCs si associa a un profondo squilibrio del metabolismo lipidico e a una compromissione della funzionalità mitocondriale; tramite screening ad alto rendimento sono stati individuati modulatori dei MERCs che non solo aumentano il numero di contatti, ma contribuiscono anche a ripristinare il corretto traffico e metabolismo dei lipidi tra ER e mitocondri. Questo si traduce in un parziale recupero della funzione mitocondriale, in un miglioramento della gestione dello stress cellulare e, in una riduzione dei fenotipi patologici osservati nelle cellule modellate su patologie con disfunzione dei MERCs. Pur richiedendo conferme in modelli in vivo e valutazioni sulla farmacocinetica e sicurezza, i risultati suggeriscono che il targeting farmacologico dei MERCs potrebbe costituire una strategia terapeutica innovativa per correggere congiuntamente deficit energetici e lipidici negli MN e nelle cellule gliali coinvolte nella patogenesi della SLA⁷⁰.

Un ulteriore approccio farmacologico riguarda la modulazione della segnalazione di Ca^{2+} attraverso i MERCs. Dato che una parte rilevante della funzione dei MERCs è

mediata dal trasferimento di Ca^{2+} dall'ER al mitocondrio, modulare i canali coinvolti (come i recettori IP3R o i canali VDAC) potrebbe permettere di normalizzare l'omeostasi del Ca^{2+} e migliorare la capacità dei mitocondri di rispondere allo stress energetico. In questo caso, piccole molecole in grado di interferire selettivamente con l'interazione tra IP3R, VDAC e le proteine adattatrici (ad esempio GRP75) si stanno rivelando promettenti in altre patologie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, dove la riduzione del sovraccarico di Ca^{2+} mitocondriale si associa a un miglioramento della sopravvivenza neuronale e della funzione sinaptica. Strategie di intervento mirate ai canali del Ca^{2+} o alle proteine che li regolano sono attualmente oggetto di studio in altre condizioni di disfunzione dei MERCs, suggerendo la plausibilità di estendere tali approcci alla SLA, sia per ridurre lo stress ossidativo e apoptotico, sia per ristabilire una più corretta integrazione tra metabolismo energetico, proteostasi e risposta infiammatoria gliale. Rimane tuttavia cruciale, nelle prospettive future, chiarire in modelli specifici di SLA se la modulazione farmacologica dei flussi di Ca^{2+} ai MERCs possa ottenere un beneficio terapeutico senza compromettere le funzioni fisiologiche di questi contatti, definendo così finestre di intervento temporali e dosaggi compatibili con un'applicazione clinica⁷¹.

Nonostante le evidenze raccolte finora siano complessivamente promettenti, la traslazione clinica delle strategie di modulazione dei MERCs rimane attualmente ferma a una fase iniziale di sviluppo poiché tali domini rappresentano siti di elevata complessità da un punto di vista funzionale e, inoltre, non risultano specifici per gli MN ma li ritroviamo anche in altre tipologie cellulari, quali ad esempio le cellule gliali. Questa distribuzione eterogenea rende, di conseguenza, particolarmente complessa la possibilità di evitare effetti off-target associati all'intervento terapeutico. Tuttavia, il crescente approfondimento dei meccanismi molecolari che regolano formazione e controllo dei MERCs fornisce basi sempre più solide per sviluppare strategie farmacologiche mirate per le malattie neurodegenerative multifattoriali, tra cui la SLA.

Come anticipato in precedenza, è importante sottolineare che i MERCs non rappresentano microdomini esclusivi del MN, ma risultano presenti anche nelle cellule gliali, quali astrociti e microglia; pertanto, una prospettiva di ricerca particolarmente rilevante nella SLA è rappresentata dall'ampliamento dell'analisi di questi siti oltre il solo compartimento neuronale. Sebbene gli studi sui MERCs si siano finora concentrati prevalentemente nei neuroni, vi è un crescente interesse per il ruolo che queste strutture possono svolgere anche nelle cellule gliali, che partecipano attivamente alla fisiopatologia della neurodegenerazione tramite il supporto metabolico, regolazione dell'omeostasi ionica e modulazione delle risposte infiammatorie⁷². Gli astrociti svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'equilibrio ionico extracellulare, nella rimozione dei neurotrasmettitori e nel sostegno metabolico ai neuroni. Evidenze sperimentali indicano che, in condizioni di stress o di danno cerebrale, si verificano alterazioni nella distribuzione dei mitocondri e dei MERCs all'interno degli astrociti, suggerendo che tali strutture possano modulare l'attività gliale e influenzare la risposta del tessuto al danno⁷³. Questi dati suggeriscono che i MERCs negli astrociti potrebbero partecipare a processi metabolici e di segnalazione rilevanti; ciò apre la possibilità che tali alterazioni contribuiscano, direttamente o indirettamente, alla progressione della SLA, ipotesi che richiede però ulteriori studi causali e contestualizzazione rispetto ai modelli patologici specifici. Parallelamente, nella microglia, ovvero le cellule immunitarie residenti nel SNC, i contatti MERCs risultano coinvolti nella regolazione dell'immunometabolismo, nella produzione di ROS e nella modulazione della risposta infiammatoria, tutti processi potenzialmente rilevanti nelle fasi avanzate delle malattie neurodegenerative⁷⁴. Nel complesso, l'analisi dei MERCs nelle cellule gliali può fornire nuove conoscenze sui meccanismi non neuronali coinvolti nella neurodegenerazione e suggerire strategie terapeutiche che superino il paradigma della sola protezione neuronale, includendo in maniera esplicita il ruolo del microambiente cellulare che modula la sopravvivenza del MN. Integrare lo studio dei MERCs nelle cellule gliali con gli attuali modelli sperimentali di SLA rappresenta pertanto una prospettiva di ricerca futura di rilevante interesse, con potenziali implicazioni sia sulla più approfondita

comprensione dei meccanismi patogenetici sia sulla possibile modulazione della malattia.

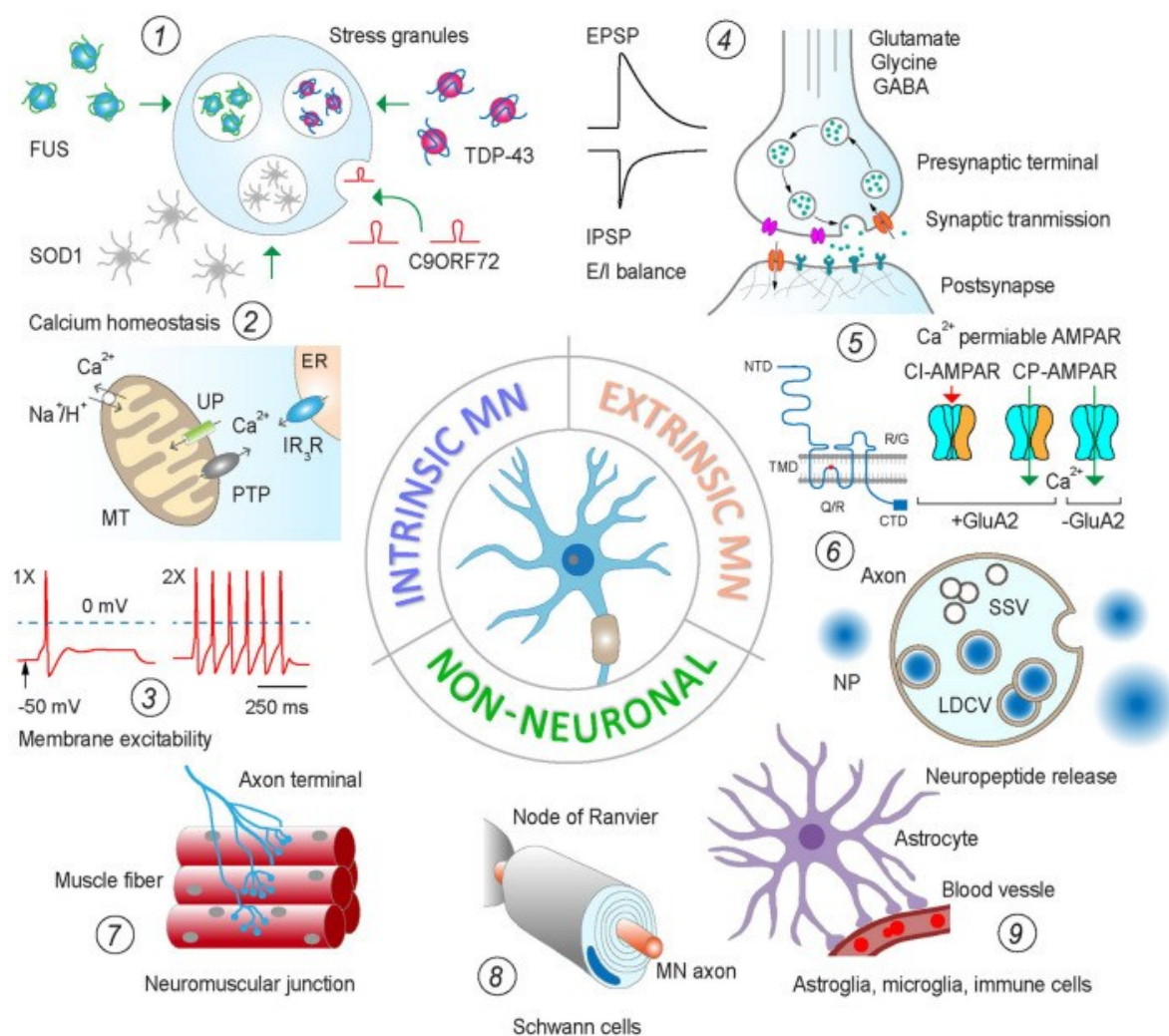


Figura 4.1 – Rappresentazione schematica dei principali meccanismi cellulari e non neuronali coinvolti nella vulnerabilità del MN nella SLA. Sono illustrati processi intrinseci neuronali, tra cui stress proteostatico associato a TDP-43, FUS, SOD1 e C9orf72, alterazioni dell'omeostasi del Ca²⁺, disfunzione mitocondriale ed eccitabilità di membrana, insieme a meccanismi estrinseci e non neuronali che coinvolgono la trasmissione sinaptica, il rilascio di neuropeptidi e il contributo delle cellule gliali⁷⁵.

In conclusione, le evidenze presentate in questo elaborato sostengono l'idea che i MERCs costituiscano un nodo integrativo fondamentale nello sviluppo della SLA. La compresenza di alterazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} , del metabolismo dei lipidi, dell'energia cellulare, della degradazione e del mantenimento della qualità proteica, insieme alle risposte agli stati di sofferenza mitocondriale suggerisce che le interfacce di contatto tra ER e mitocondri rappresentano al tempo stesso un punto critico di vulnerabilità e un bersaglio privilegiato per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate. Le prospettive future di ricerca indicano inoltre che lo studio dei MERCs non debba limitarsi ai neuroni ma estendersi anche alle cellule gliali, includendo in particolare astrociti e microglia che svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi del microambiente neuronale. Comprendere come le alterazioni dei MERCs contribuiscano alla comunicazione neuronale e gliale potrebbe aprire nuove strategie terapeutiche mirate, volte a ripristinare l'omeostasi cellulare e rallentare la progressione della malattia. Pertanto i MERCs si configurano come promettenti target innovativi per futuri approcci terapeutici.

Bibliografia

1. Montiel-Troya, M. *et al.* Advancements in Pharmacological Interventions and Novel Therapeutic Approaches for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomedicines* **12**, 2200 (2024).
2. Obrador, E. *et al.* The Link between Oxidative Stress, Redox Status, Bioenergetics and Mitochondria in the Pathophysiology of ALS. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6352 (2021).
3. Liu, J. & Yang, J. Mitochondria-associated membranes: A hub for neurodegenerative diseases. *Biomed. Pharmacother.* **149**, 112890 (2022).
4. Eisen, A., Vucic, S. & Mitsumoto, H. History of ALS and the competing theories on pathogenesis: IFCN handbook chapter. *Clin. Neurophysiol. Pract.* **9**, 1–12 (2023).
5. Ilieva, H., Vullaganti, M. & Kwan, J. Advances in molecular pathology, diagnosis, and treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *The BMJ* **383**, e075037 (2023).
6. Feldman, E. L. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* **400**, 1363–1380 (2022).
7. Zayia, L. C. & Tadi, P. Neuroanatomy, Motor Neuron. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).
8. Zuccaro, E., Piol, D., Basso, M. & Pennuto, M. Motor Neuron Diseases and Neuroprotective Peptides: A Closer Look to Neurons. *Front. Aging Neurosci.* **13**, 723871 (2021).

9. Slater, C. R. The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2183 (2017).
10. Taylor, J. P., Brown, R. H. & Cleveland, D. W. Decoding ALS: From Genes to Mechanism. *Nature* **539**, 197–206 (2016).
11. Masrori, P. & Van Damme, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* **27**, 1918–1929 (2020).
12. Štětkářová, I. & Ehler, E. Diagnostics of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Up to Date. *Diagnostics* **11**, 231 (2021).
13. Peggion, C. *et al.* SOD1 in ALS: Taking Stock in Pathogenic Mechanisms and the Role of Glial and Muscle Cells. *Antioxidants* **11**, 614 (2022).
14. Balendra, R. & Isaacs, A. M. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat. Rev. Neurol.* **14**, 544–558 (2018).
15. Kumar, S. & Julien, J.-P. TDP-43 triggers immune response via mitochondrial DNA release. *Cell Res.* **31**, 379–380 (2021).
16. Alirzayeva, H. *et al.* ALS-FUS mutations cause abnormal PARylation and histone H1.2 interaction, leading to pathological changes. *Cell Rep.* **43**, (2024).
17. Vanderhaeghe, S. *et al.* A pathogenic mutation in the ALS/FTD gene VCP induces mitochondrial hypermetabolism by modulating the permeability transition pore. *Acta Neuropathol. Commun.* **12**, 161 (2024).
18. Calió, M. L. *et al.* Mitochondrial Dysfunction, Neurogenesis, and Epigenetics: Putative Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Neurodegeneration and Treatment. *Front. Neurosci.* **14**, 679 (2020).

19. Zhao, W., Beers, D. R. & Appel, S. H. Immune-mediated Mechanisms in the Pathoprogession of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* **8**, 888–899 (2013).
20. Shirokova, O. M., Pchelin, P. V. & Mukhina, I. V. MERCs. The Novel Assistant to Neurotransmission? *Front. Neurosci.* **14**, 589319 (2020).
21. Javadov, S., Kozlov, A. V. & Camara, A. K. S. Mitochondria in Health and Diseases. *Cells* **9**, 1177 (2020).
22. Lynes, E. M. & Simmen, T. Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): How diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1813**, 1893–1905 (2011).
23. Phillips, M. J. & Voeltz, G. K. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 69–82 (2016).
24. Aoyama-Ishiwatari, S. & Hirabayashi, Y. Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Contact Sites—Emerging Intracellular Signaling Hubs. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 653828 (2021).
25. Larrañaga-SanMiguel, A., Bengoa-Vergniory, N. & Flores-Romero, H. Crosstalk between mitochondria–ER contact sites and the apoptotic machinery as a novel health meter. *Trends Cell Biol.* **35**, 33–45 (2025).
26. Copeland, D. E. & Dalton, A. J. An Association between Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum in Cells of the Pseudobranch Gland of a Teleost. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 393–396 (1959).
27. Porter, K. R. & Palade, G. E. STUDIES ON THE ENDOPLASMIC RETICULUM. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 269–300 (1957).

28. Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. I. Recovery of rapidly sedimenting endoplasmic reticulum in association with mitochondria. *J. Cell Biol.* **72**, 714–725 (1977).
29. Vance, J. E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 595–609 (2014).
30. Scorrano, L. *et al.* Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.* **10**, 1287 (2019).
31. Csordás, G., Weaver, D. & Hajnóczky, G. ER-mitochondrial contact-ology: structure and signaling functions. *Trends Cell Biol.* **28**, 523–540 (2018).
32. Giacomello, M. & Pellegrini, L. The coming of age of the mitochondria–ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ.* **23**, 1417–1427 (2016).
33. Csordás, G., Weaver, D. & Hajnóczky, G. ER-mitochondrial contact-ology: structure and signaling functions. *Trends Cell Biol.* **28**, 523–540 (2018).
34. Szabadkai, G. *et al.* Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* **175**, 901–911 (2006).
35. Lim, D. *et al.* Ca²⁺ handling at the mitochondria-ER contact sites in neurodegeneration. *Cell Calcium* **98**, 102453 (2021).
36. Atakpa-Adaji, P. & Ivanova, A. IP3R at ER-Mitochondrial Contact Sites: Beyond the IP3R-GRP75-VDAC1 Ca²⁺ Funnel. *Contact* **6**, 25152564231181020 (2023).
37. Liu, Y. *et al.* DJ-1 regulates the integrity and function of ER-mitochondria association through interaction with IP3R3-Grp75-VDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 25322–25328 (2019).

38. Rühmkorf, A. & Harbauer, A. B. Role of Mitochondria–ER Contact Sites in Mitophagy. *Biomolecules* **13**, 1198 (2023).
39. Casas-Martinez, J. C. *et al.* Adaptive ER stress promotes mitochondrial remodelling and longevity through PERK-dependent MERCS assembly. *Cell Death Differ.* 1–16 (2025) doi:10.1038/s41418-025-01603-7.
40. Casas-Martinez, J. C., Samali, A. & McDonagh, B. Redox regulation of UPR signalling and mitochondrial ER contact sites. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **81**, 250 (2024).
41. Moltedo, O., Remondelli, P. & Amodio, G. The Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Contacts and Their Critical Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 172 (2019).
42. Monaghan, R. M. The fundamental role of mitochondria–endoplasmic reticulum contacts in ageing and declining healthspan. *Open Biol.* **15**, 240287.
43. Filadi, R. *et al.* Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E2174–E2181 (2015).
44. Han, S. *et al.* The role of Mfn2 in the structure and function of endoplasmic reticulum-mitochondrial tethering in vivo. *J. Cell Sci.* **134**, jcs253443 (2021).
45. Zaman, M. & Shutt, T. E. The Role of Impaired Mitochondrial Dynamics in MFN2-Mediated Pathology. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 858286 (2022).
46. De Vos, K. J. *et al.* VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1299–1311 (2012).
47. Gomez-Suaga, P. *et al.* The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. *Curr. Biol.* **27**, 371–385 (2017).

48. Iwasawa, R., Mahul-Mellier, A.-L., Datler, C., Pazarentzos, E. & Grimm, S. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria–ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J.* **30**, 556–568 (2011).
49. Wang, B., Nguyen, M., Chang, N. C. & Shore, G. C. Fis1, Bap31 and the kiss of death between mitochondria and endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **30**, 451–452 (2011).
50. Scorrano, L. *et al.* Coming together to define membrane contact sites. *Nat. Commun.* **10**, 1287 (2019).
51. Csordás, G., Weaver, D. & Hajnóczky, G. ER-mitochondrial contact-ology: structure and signaling functions. *Trends Cell Biol.* **28**, 523–540 (2018).
52. Paillusson, S. *et al.* There’s Something Wrong with my MAM; the ER–Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci.* **39**, 146–157 (2016).
53. Smith, E. F., Shaw, P. J. & De Vos, K. J. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* **710**, 132933 (2019).
54. Filadi, R. *et al.* Presenilin 2 Modulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Coupling by Tuning the Antagonistic Effect of Mitofusin 2. *Cell Rep.* **15**, 2226–2238 (2016).
55. Marchi, S. *et al.* Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium* **69**, 62–72 (2018).
56. Wilson, E. L. & Metzakopian, E. ER-mitochondria contact sites in neurodegeneration: genetic screening approaches to investigate novel disease mechanisms. *Cell Death Differ.* **28**, 1804–1821 (2021).

57. Gomez-Suaga, P. *et al.* Disruption of ER-mitochondria tethering and signalling in C9orf72-associated amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Aging Cell* **21**, e13549 (2022).
58. Dafinca, R., Barbagallo, P. & Talbot, K. The Role of Mitochondrial Dysfunction and ER Stress in TDP-43 and C9ORF72 ALS. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, 653688 (2021).
59. Stoica, R. *et al.* ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* **5**, 3996 (2014).
60. Stoica, R. *et al.* ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3 β to disrupt the VAPB-PTPIP51 interaction and ER-mitochondria associations. *EMBO Rep.* **17**, 1326-1342 (2016).
61. Ghemrawi, R. & Khair, M. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6127 (2020).
62. Chen, J., Bassot, A., Giuliani, F. & Simmen, T. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): Stressed by Dysfunctional Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contacts (MERCs). *Cells* **10**, 1789 (2021).
63. Casas-Martinez, J. C., Samali, A. & McDonagh, B. Redox regulation of UPR signalling and mitochondrial ER contact sites. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **81**, 250 (2024).
64. Smith, E. F., Shaw, P. J. & De Vos, K. J. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* **710**, 132933 (2019).

65. Rühmkorf, A. & Harbauer, A. B. Role of Mitochondria–ER Contact Sites in Mitophagy. *Biomolecules* **13**, 1198 (2023).
66. Böckler, S. & Westermann, B. ER-mitochondria contacts as sites of mitophagosome formation. *Autophagy* **10**, 1346–1347 (2014).
67. Moltedo, O., Remondelli, P. & Amodio, G. The Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Contacts and Their Critical Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 172 (2019).
68. Wilson, E. L. & Metzakopian, E. ER-mitochondria contact sites in neurodegeneration: genetic screening approaches to investigate novel disease mechanisms. *Cell Death Differ.* **28**, 1804–1821 (2021).
69. Nijssen, J., Comley, L. H. & Hedlund, E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **133**, 863–885 (2017).
70. Etxebeste-Mitxelorena, M. *et al.* Modulation of Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Contacts (MERCs) by Small Molecules as a New Strategy for Restoring Lipid Metabolism in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *J. Med. Chem.* **68**, 1179–1194 (2025).
71. Dentoni, G., Castro-Aldrete, L., Naia, L. & Ankarcrona, M. The Potential of Small Molecules to Modulate the Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Interplay in Alzheimer’s Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 920228 (2022).
72. Philips, T. & Rothstein, J. Glial cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp. Neurol.* **262PB**, 111–120 (2014).

73. Göbel, J. *et al.* Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contacts in Reactive Astrocytes Promote Vascular Remodeling. *Cell Metab.* **31**, 791-808.e8 (2020).
74. Navarro, E. & Montesinos, J. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Microglia: One Contact Site to Rule Them all. *Contact* **8**, 25152564241312807 (2025).
75. Ovsepian, S. V., O'Leary, V. B. & Martinez, S. Selective vulnerability of motor neuron types and functional groups to degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: review of the neurobiological mechanisms and functional correlates. *Brain Struct. Funct.* **229**, 1–14 (2024).

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare mia mamma. Senza di lei oggi non sarei qui. È il mio punto di riferimento costante, la mia forza nei momenti di difficoltà e la mia sicurezza nei momenti di incertezza. Mi ha sostenuta in ogni fase del mio percorso, ha creduto sempre nelle mie capacità anche quando io stessa ne dubitavo, spronandomi a non arrendermi mai. Spero di renderti sempre orgogliosa di me.

Vorrei ringraziare mio nonno Valerio, sempre pronto ad ascoltarmi ripetere prima di ogni esame, anche quando non comprendeva appieno ciò di cui parlavo ma, al termine, mi diceva sempre che era tutto chiaro.

Un pensiero di gratitudine va anche a mio zio Alberto, per il sostegno costante, la vicinanza dimostrata in ogni fase di questo percorso e l'incoraggiamento a non mollare mai.

Un grazie speciale va alle mie amiche Elisa e Marzia, per aver sempre compreso i miei "non posso, devo studiare" e per non avermi mai fatto sentire in colpa per le rinunce. Mi sono state accanto nei momenti di maggiore ansia e stanchezza, sostenendomi con affetto, pazienza e parole giuste al momento giusto. La loro presenza ha reso questo percorso meno solitario.

Vorrei ringraziare anche la mia cagnolina Mia, la mia compagna di avventure. Mi è stata accanto in ogni giornata di studio, la sua presenza silenziosa ma rassicurante ha reso più leggere le ore di fatica.

Infine desidero ringraziare me stessa, per tutte le volte in cui ho creduto di non essere abbastanza e di non farcela. Per non essermi fermata, anche quando sembrava troppo difficile, e per aver continuato a provarci nonostante tutto. Spero che questo traguardo possa aiutarmi a cambiare idea, a guardarmi con maggiore fiducia e a ricordarmi che la determinazione e la costanza possono portare più lontano di quanto si pensi.