

## Germana Coccozza

L'attività scientifica del Dottorato di Ricerca in NEUROSCIENZE CLINICO-SPERIMENTALI E PSICHIATRIA (31° ciclo), Curricula: a) NEUROFISIOLOGIA, è in corso di svolgimento presso il laboratorio di Neuroimmunologia diretto dalla Prof.ssa Cristina Limatola, nell'ambito del progetto **“Ruolo dei canali del potassio calcio dipendenti (KCa3.1) nella Sclerosi Laterale Amiotrofica”**. La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia neurodegenerativa che determina debolezza muscolare progressiva e insufficienza respiratoria dovute a degenerazione selettiva dei motoneuroni nella corteccia motoria, nel tronco encefalico e nel midollo spinale. Recenti studi suggeriscono che l'attivazione della microglia e la neuroinfiammazione possono svolgere un ruolo importante nella SLA (1). Le cellule microgliali sono la principale difesa immunitaria nel sistema nervoso centrale (SNC).

L'attivazione della microglia avviene dopo qualsiasi lesione del SNC, inclusi i disturbi neurodegenerativi (2,3). Nei pazienti affetti da SLA, l'attivazione microgliale è stata documentata nei primi anni novanta in tessuti umani post-mortem (4,5,6,7). Evidenze dell'attivazione microgliale durante la progressione della malattia sono state ottenute in modelli animali SLA (topi e ratti) nelle fasi iniziali e finali, con un andamento crescente (8,9,10,11,12,13,14). Le citochine infiammatorie rilasciate dalle cellule microgliali attivate potrebbero potenziare la degenerazione dei neuroni motori. Infatti in condizioni normali, così come nelle fasi iniziali della SLA, le cellule microgliali attivate rilasciano molecole neuroprotettive per evitare e contenere la degenerazione neuronale ma nel corso della malattia è stato dimostrato un massiccio rilascio di fattori neurotossici da parte della stessa microglia (15,16). Sia nel modello animale hSOD1G93A sia nei pazienti affetti da SLA, è stata dimostrata una correlazione tra lo stato di attivazione microgliale e la gravità della malattia (17,18). Questi dati suggeriscono una comunicazione bidirezionale neurone-microglia che può partire dal neurone danneggiato in grado di modificare il fenotipo della microglia o viceversa. Un target promettente per controllare il fenotipo della microglia, e quindi la degenerazione neuronale, è rappresentato dai canali del potassio calcio dipendenti (KCa3.1), a conduttanza intermedia espressi dalla microglia. Questo canale ionico è coinvolto nell'attivazione microgliale in diverse patologie. In particolare l'inibizione del KCa3.1 è in grado di ridurre l'area infartuata e l'invasività delle cellule tumorali in modelli animali di ischemia cerebrale e glioma e di ridurre la neurotossicità indotta dalla microglia dopo trattamento con oligomeri della proteina beta amiloide e il lipopolisaccaride (LPS) (19, 20, 21). Recentemente è stato inoltre dimostrato che il canale KCa3.1 è un ottimo target per indurre nella microglia un cambio dello stato di attivazione nel microambiente tumorale (22). L'obiettivo primario di questo studio è quello di contribuire al progresso delle conoscenze di base sull'insorgenza e la progressione della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). Il razionale di questo progetto prevede la possibilità di modificare lo stato di attivazione microgliale modulando la funzionalità del KCa3.1, un canale profondamente coinvolto nelle funzioni cellulari, con inibitori selettivi per fermare o ridurre il meccanismo che contribuisce alla degenerazione dei motoneuroni. Inizialmente abbiamo analizzato il livello di espressione dei canali KCa3.1 in cellule microgliali isolate dal midollo spinale di topi SOD1G93A, per indagare il loro possibile coinvolgimento nella modulazione del fenotipo di queste cellule nella fase sintomatica della malattia. I dati ottenuti, mediante PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR), hanno mostrato un notevole aumento del gene KCNN4 nella microglia di topi SOD1G93A rispetto alle cellule isolate da topi WT della stessa età. Successivamente per valutare direttamente il ruolo svolto dall'attività del canale KCa3.1 nel modulare il fenotipo microgliale, siamo andati a studiare gli effetti del blocco dell'attività del KCa3.1 nel modello murino hSOD1G93A, che riassume molte caratteristiche della malattia umana. In questo studio, abbiamo usato l'inibitore selettivo del KCa3.1, il 1 - [(2-Chlorophenyl) difenilmetil] - 1Hpirazolo (TRAM-34), per trattare i topi SOD1G93A da uno stadio pre-sintomatico della patologia e analizzare lo stato di attivazione microgliale andando a misurare il livello di espressione di geni pro e anti-infiammatori, la morfologia delle cellule microgliali e l'effetto del trattamento sulla sopravvivenza dei motoneuroni su fettine di midollo spinale lombare. Nello specifico abbiamo dimostrato che l'inibizione dell'attività del KCa3.1 nei topi SOD1G93A: i) ha ridotto l'espressione di

geni pro-infiammatori e contemporaneamente aumentato l'espressione di geni anti-infiammatori in cellule microgliali isolate dal midollo spinale lombare; ii) ha favorito un fenotipo / morfologia antinfiammatoria e una maggiore sorveglianza attiva che la microglia esercita attraverso i suoi domini; iii) ha aumentato il numero di neuroni motori sani nelle corna ventrali. Inoltre, i dati raccolti sulle condizioni generali (peso corporeo, test sulla forza muscolare e coordinazione motoria) dei topi trattati e i loro rispettivi controlli, dimostrano che il trattamento con l'inibitore selettivo del KCa3.1 ha effetti benefici anche sulla progressione della patologia, ritardando l'insorgenza dei sintomi motori di circa tre settimane. Questi dati avvalorano la nostra ipotesi di un coinvolgimento del KCa3.1 nell'attivazione microgliale nella Sclerosi Laterale Amiotrofica e confermano ulteriormente l'importante ruolo di queste cellule nella progressione della malattia. Per avere un quadro completo sugli effetti benefici dell'inibizione del canale, il prossimo passo sarà quello di valutare la durata media della vita dei topi trattati con il TRAM-34 o solo con il veicolo (olio di arachidi) attraverso la costruzione di curve di sopravvivenza (Kaplan-Meier), per capire se globalmente il canale KCa3.1 microgliale possa essere considerato un buon target terapeutico per contrastare la progressione della SLA. E' importante sottolineare che il TRAM-34 è stato usato in molti studi preclinici ed è stata anche constatata la non tossicità della molecola in trattamenti prolungati (23). Diversi canali per il potassio sono stati proposti come target terapeutici per varie malattie neurologiche come la sclerosi multipla, il morbo di Parkinson, l'ictus e il dolore (24). Approfondire le conoscenze sul ruolo dello stato di attivazione della microglia e dei canali del potassio, da essa espressi, nei meccanismi alla base della patologia, potrebbe favorire la scoperta di un marcatore precoce della Sclerosi Laterale Amiotrofica nonché un possibile target terapeutico (KCa3.1).