

1. Record Nr.	TD20012302
Autore	DI BIASE, ERIKA
Titolo	GM1 OLIGOSACCHARIDE ACCOUNTS FOR GM1 ROLE IN ENHANCING NEURONAL DEVELOPMENT ACTING ON TRKA-MAPK PATHWAY [Tesi di dottorato]
Editore	Università degli Studi di Milano, 2019-12-05
Lingua di pubblicazione	Inglese
Formato	Tesi di dottorato
Livello bibliografico	Monografia
Note	diritti: info:eu-repo/semantics/openAccess In relazione con info:eu-repo/semantics/altIdentifier/hdl/2434/692335
Sommario	<p>Il ganglioside GM1 è un glicosfingolipide mono-sialilato presente nello strato esterno della membrana plasmatica cellulare ed è particolarmente abbondante nei neuroni. Numerosi studi in vitro e in vivo evidenziano il ruolo del GM1 non solo come componente strutturale ma anche come regolatore di diversi processi cellulari. Infatti, l'arricchimento di GM1 nei microdomini di membrana promuove il differenziamento e la protezione neuronale. Inoltre il contenuto di GM1 è essenziale per la sopravvivenza e il mantenimento dei neuroni. Nonostante vi siano numerose evidenze sugli effetti neuronotrofici mediati dal GM1, la conoscenza del meccanismo d'azione sottostante è scarsa. Recentemente, la catena oligosaccaridica del GM1 (oligoGM1) è stata identificata come responsabile delle proprietà neuritogeniche del ganglioside GM1 nelle cellule di neuroblastoma. Gli effetti mediati dall'oligoGM1 dipendono dal suo legame con il recettore specifico dell' NGF, il TrkA, determinando così l'attivazione della via TrkA-MAPK. In questo contesto, il mio lavoro di dottorato mirava a confermare il ruolo dell' oligoGM1, come componente bioattiva dell'intero ganglioside GM1, capace di stimolare i processi di differenziamento e maturazione dei neuroni granulari cerebellari di topo. Come prima cosa, abbiamo</p>

eseguito analisi morfologiche in time-course sui neuroni primari coltivati in presenza o in assenza dei gangliosidi GM1 o GD1a (il quale rappresenta il diretto precursore catabolico del GM1), somministrati esogenamente. Abbiamo osservato che entrambi i gangliosidi aumentavano l'aggregazione e l'arborizzazione dei neuroni. Dopo successiva somministrazione dei rispettivi oligosaccaridi, abbiamo osservato che solo l'oligoGM1 favoriva la migrazione dei neuroni, mentre l'oligoGD1a non induceva nessun effetto discriminante rispetto alle cellule controllo. Questo risultato suggerisce l'importanza della specifica struttura saccaridica del GM1 nella mediazione degli effetti neuronotrofici del ganglioside. Quindi abbiamo caratterizzato biochimicamente l'effetto mediato dall'oligoGM1 nei neuroni e abbiamo osservato un più elevato tasso di fosforilazione delle proteine FAK e Src, le quali rappresentano i regolatori intracellulari chiave della motilità neuronale. Inoltre, in presenza dell'oligoGM1 i neuroni granulari cerebellari mostravano un aumento del livello di marcatori neuronali specifici (ad es. 3-Tubulina, Tau, Neuroglicano C, Sinapsina), suggerendo uno stadio di maturazione più avanzato rispetto ai controlli. Inoltre, abbiamo scoperto che l'oligoGM1 accelera l'espressione del pattern di gangliosidi tipico dei neuroni maturi che è caratterizzato da alti livelli di gangliosidi complessi (cioè GM1, GD1a, GD1b e GT1b) e basso livello del ganglioside più semplice GM3. Per studiare il meccanismo d'azione dell'oligoGM1, abbiamo usato il suo derivato marcato con il trizio e abbiamo scoperto che l'oligoGM1 interagisce con la superficie cellulare senza entrare nelle cellule. Questa scoperta suggerisce la presenza di un bersaglio biologico sulla membrana plasmatica neuronale. È interessante notare che abbiamo riscontrato una precoce attivazione della via di segnalazione del TrkA associata alle MAP chinasi in seguito alla somministrazione dell'oligoGM1 nelle culture neuronali. Questo risultato suggerisce che questo evento rappresenti un punto di partenza degli effetti dell'oligoGM1 nei neuroni. I nostri dati rivelano che gli effetti del ganglioside GM1 sul differenziamento e la maturazione neuronale sono mediati dalla sua porzione di oligosaccaride. Infatti, l'oligoGM1 interagisce con la superficie cellulare, innescando così l'attivazione di processi biochimici intracellulari che sono responsabili della migrazione neuronale, dell'emissione dei dendriti e della crescita degli assoni. Nel complesso, i nostri risultati sottolineano l'importanza dell'oligoGM1 come un nuovo e promettente fattore neurotrofico. The GM1 ganglioside is a mono-sialylated glycosphingolipid present in the outer layer of the cell plasma membrane and abundant in neurons. Numerous in vitro and in vivo studies highlight the role of GM1 not only as a structural component but also as a functional regulator. Indeed, GM1 enrichment in membrane microdomains promotes neuronal differentiation and protection, and the GM1 content is essential for neuronal survival and maintenance. Despite many lines of evidence on the GM1-mediated neuronotrophic effects, our knowledge on the underlying mechanism of action is scant. Recently, the oligosaccharide chain of GM1 (oligoGM1) has been identified as responsible for the neuritogenic properties of the GM1 ganglioside in neuroblastoma cells. The oligoGM1-mediated effects depend on its binding to the NGF specific receptor TrkA, thus resulting in the TrkA-MAPK pathway activation. In this context, my PhD work aimed to confirm the role of the oligoGM1, as the bioactive portion of the entire GM1 ganglioside, capable of enhancing the differentiation and maturation processes of mouse cerebellar granule neurons. First, we performed time course morphological analyses on

mouse primary neurons plated in the presence or absence of exogenously administered gangliosides GM1 or GD1a (direct GM1 catabolic precursor). We found that both gangliosides increased neuron clustering and arborization, however only oligoGM1 and not oligoGD1a induced the same effects in prompting neuron migration. This result suggests the importance of the specific GM1 saccharide structure in mediating neuronotrophic effects. Then we characterized biochemically the oligoGM1-mediated effect in mouse primary neurons, and we observed a higher phosphorylation rate of FAK and Src proteins which are the intracellular key regulators of neuronal motility. Moreover, in the presence of oligoGM1 cerebellar granule neurons showed increased level of specific neuronal markers (e.g., 3-Tubulin, Tau, Neuroglycan C, Synapsin), suggesting an advanced stage of maturation compared to controls. In addition, we found that the oligoGM1 accelerates the expression of the typical ganglioside pattern of mature neurons which is characterized by high levels of complex gangliosides (i.e., GM1, GD1a, GD1b, and GT1b) and low level of the simplest one, the GM3 ganglioside. To study the mechanism of action of the oligoGM1, we used its tritium labeled derivative and we found that the oligoGM1 interacts with the cell surface without entering the cells. This finding suggests the presence of a biological target at the neuronal plasma membrane. Interestingly, we observed the TrkA-MAP kinase pathway activation as an early event underlying oligoGM1 effects in neurons. Our data reveal that the effects of GM1 ganglioside on neuronal differentiation and maturation are mediated by its oligosaccharide portion. Indeed, oligoGM1 interacts with the cell surface, thus triggering the activation of intracellular biochemical pathways that are responsible for neuronal migration, dendrites emission and axon growth. Overall, our results point out the importance of oligoGM1 as a new promising neurotrophic player.

Localizzazioni e accesso

http://memoria.depositolegale.it/*/http://hdl.handle.net/2434/692335
