



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Coordinatore del Corso: Prof. Andrea Fausto Piana

CURRICULUM IN FISIOPATOLOGIA MEDICA

Responsabile di Curriculum: Prof. Roberto Manetti

XXX CICLO

**Danno ossidativo ed aggregati proteici nella
Sclerosi Laterale Amiotrofica.
Possibili target diagnostici e terapeutici**

Coordinatore:

Prof. Andrea Fausto Piana

Tutor:

Prof. Roberto Manetti

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Maria Luigia Biggio

Anno Accademico 2017/2018

A volte anche la speranza
può prendersi un po' di riposo,
ma poi
ritorna sempre a bussare
alla porta della vita

INDICE

Abbreviazioni

CAPITOLO 1: Introduzione	Pag. 1
1.1 Le Malattie Neurodegenerative.....	Pag. 1
1.2 La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).....	Pag. 3
1.3 Epidemiologia.....	Pag. 5
1.4 L'Esordio della SLA.....	Pag. 6
1.5 La Progressione della SLA.....	Pag. 8
1.6 Eziologia.....	Pag. 9
1.6.1 Fattori Ambientali.....	Pag. 10
1.6.2 Fattori Genetici.....	Pag. 12
1.6.3 Superossido Dismutasi 1 (Cu/Zn SOD1).....	Pag. 14
1.6.3.1 Struttura e Funzioni.....	Pag. 14
1.6.3.2 Mutazioni della SOD1 nella SLA 1.....	Pag. 17
1.6.3.3 Modelli Animali e Cellulari per la SOD1 ^{G93A}	Pag. 21
1.6.4 Proteina B di Membrana Associata alle Vescicole (VAPB).....	Pag. 24
1.6.4.1 Struttura e Funzioni.....	Pag. 24
1.6.4.2 Mutazioni della VAPB nella SLA 8.....	Pag. 26
1.6.4.3 Modelli Animali e Cellulari per la VAPB ^{P56S}	Pag. 30
1.7 Patogenesi.....	Pag. 31
1.7.1 Stress Ossidativo.....	Pag. 34
1.7.2 Alterazioni mitocondriali.....	Pag. 35
1.7.3 Accumulo di Proteine Anomale.....	Pag. 36
1.7.4 Eccitotossicità da Glutammato.....	Pag. 37
1.7.5 Alterazioni nel Trasporto Assonale.....	Pag. 38
1.7.6 Neuroinfiammazione e ruolo delle cellule non-neuronali..	Pag. 39
1.7.7 Alterazioni nel processamento del RNA.....	Pag. 41
1.7.8 Apoptosi.....	Pag. 42
1.7.9 Alterazioni dei Sistemi Cellulari di Difesa allo Stress.....	Pag. 46
1.7.9.1 Autofagia.....	Pag. 46
1.7.9.2 Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS).....	Pag. 49

1.7.9.3 Sistema di risposta alle proteine non-ripiegate (UPR).....	Pag. 52
1.8 Diagnosi.....	Pag. 55
1.9 Terapia.....	Pag. 58
1.10 La Ricerca sulla SLA in Italia e nel Mondo.....	Pag. 61
1.11 Le Nanoparticelle di Ossido di Cerio (Nanoceria).....	Pag. 65
1.12 La Nanoceria nelle Malattie Neurodegenerative.....	Pag. 68
CAPITOLO 2: Razionale dello studio e Obiettivi	Pag. 69
CAPITOLO 3: Materiali	Pag. 71
3.1 Linee Cellulari.....	Pag. 71
Cellule Staminali Neuronalì murine (NSC-34).....	Pag. 71
Fibroblasti murini (L929).....	Pag. 73
Fibroblasti umani.....	Pag. 74
Cellule HeLa.....	Pag. 75
Cellule Polimorfonucleate umane (PBMC).....	Pag. 75
3.2 Attivazione trascrizionale controllata da Tetraciclina (Tet-ON).....	Pag. 76
3.3 Vettori Plasmidici.....	Pag. 78
Vettore per NSC-34 (pCMV-hSOD1 ^{WT/G93A}).....	Pag. 78
Vettore per HeLa (Pcdna3.1/myc-His C).....	Pag. 78
3.4 Popolazione di studio: pazienti e controlli.....	Pag. 78
3.5 Nanoparticelle di Ossido di Cerio (Nanoceria).....	Pag. 79
3.6 Anticorpi Primari e Secondari.....	Pag. 80
3.7 Marcatori per l'apoptosi cellulare.....	Pag. 82
PE-Annexin V (BD Pharmingen TM).....	Pag. 82
PerCP-7-AAD (BD Pharmingen TM).....	Pag. 84
3.8 Citometria a flusso.....	Pag. 85

CAPITOLO 4: Metodi	Pag. 89
4.1 Colture Cellulari “ <i>in vitro</i> ”.....	Pag. 90
4.2 Isolamento dei PBMC dal sangue periferico.....	Pag. 90
4.3 Transfezione cellule eucariotiche con il metodo della Lipofectamina.....	Pag. 90
4.4 Estrazione delle proteine citoplasmatiche.....	Pag. 91
4.5 Quantificazione delle proteine con il metodo Bradford.....	Pag. 91
4.6 SDS-PAGE e Western blot.....	Pag. 92
4.7 Sintesi della Nanoceria.....	Pag. 93
4.8 Funzionalizzazione della Nanoceria con fluoresceina isotiocianato	Pag. 94
4.9 Caratterizzazione della Nanoceria.....	Pag. 94
4.10 Valutazione dell’uptake della Nanoceria nelle cellule NSC.....	Pag. 95
4.11 Saggio MTT per la vitalità cellulare.....	Pag. 96
4.12 Analisi dell’apoptosi cellulare.....	Pag. 96
4.13 Analisi della localizzazione della Nanoceria al microscopio confocale.....	Pag. 97
4.14 Valutazione dell’apoptosi mediante citometria a flusso.....	Pag. 97
4.15 Immunofluorescenza su cellule HeLa.....	Pag. 98
4.16 Immunofluorescenza su PBMC.....	Pag. 99
4.17 Analisi Statistiche.....	Pag. 99
CAPITOLO 5: Risultati e Discussione	Pag. 100
5.1 Analisi delle cellule NSC-34 come modello cellulare di SLA 1.....	Pag. 100
5.2 Sintesi e caratterizzazione della Nanoceria.....	Pag. 101
5.3 Funzionalizzazione della Nanoceria.....	Pag. 102
5.4 Valutazione della tossicità della Nanoceria nelle cellule neuronali.	Pag. 104
5.5 Uptake e localizzazione della Nanoceria nelle colture cellulari.....	Pag. 106
5.6 Valutazione dello stress ossidativo.....	Pag. 107
5.7 Effetto della Nanoceria sul danno ossidativo.....	Pag. 108
5.8 Analisi delle cellule HeLa come modello cellulare di SLA 8.....	Pag. 111
5.9 Presenza di aggregati di VAPB nei PBMC di pazienti sSLA.....	Pag. 112
5.10 Analisi Western blot su PBMC e fibroblasti umani.....	Pag. 113

CAPITOLO 6: Conclusioni	Pag. 114
CAPITOLO 7: Bibliografia	Pag. 115

Abbreviazioni

AD	Malattia di Alzheimer
AIFA	Agenzia Italiana del Farmaco
AISLA	Associazione Italiana Sclerosi Laterale Amiotrofica
AriSLA	Fondazione Italiana di Ricerca per la Sclerosi Laterale Amiotrofica
ATP	Adenosin Trifosfato
BSA	Albumina Sierica Bovina
Ca ²⁺	Ioni Calcio
Ce	Cerio
CeO ₂	Ossido di Cerio
CF	Citometria a flusso
CMA	Autofagia chaperone-mediata
CSMNs	Motoneuroni cortico-spinali
Cu/Zn SOD1	Superossido Dismutasi 1 a rame e zinco
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Acido Deossiribonucleico
Dox	Doxiciclina
EMG	Elettromiografia
EPA	Acido Eicosapentaenoico
FBS	Siero fetale bovino
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceina isotiocianato
FUS	Fused in Sarcoma
GOF	Gain of Function
H ₂ O ₂	Perossido di Idrogeno
HD	Malattia di Huntington
HDAC	Enzima Istone-deacetilasi
HeLa	Cellule di carcinoma cervicale
H-MRS	Spettroscopia con Risonanza Magnetica
HSP-70	Heat shock protein 70 kDa

IFI	Immunofluorescenza Indiretta
LOS	Loss of Function
MAM	Membrane Associate ai Mitochondri
MBR	Metals binding region
MCSs	Siti di contatto tra membrane
miRNA	microRNA
MNs	Motoneuroni
MRI	Imaging a Risonanza Magnetica
mRNA	RNA messaggero
MSP	Major Sperm Protein
Nanoceria	Nanoparticelle di Ossido di Cerio
NF	Neurofilamenti
NSC-34	Cellule Staminali Neuronalì murine
PBMC	Cellule Polimorfonucleate
PBS	Tampone Fosfato Salino
PBS-T	Tampone Fosfato Salino + Tween 20
PC12	Cellule di feocromocitoma di ratto
PD	Morbo di Parkinson
PE	Ficoeritrina
PEG	Gastrostomia Endoscopica Percutanea
PET	Tomografia ad Emissione di Positroni
PI	Ioduro di propidio
PS	Fosfatidilserina
PTPIP51	Protein tyrosine phosphatase-interacting protein-51
RE	Reticolo Endoplasmatico
RM	Risonanza Magnetica
RMN	Risonanza Magnetica Nucleare
RNA	Acido Ribonucleico
RNAi	Interferenza da RNA
RNS	Specie reattive dell'azoto
ROS	Specie reattive dell'ossigeno

SDS	Sodio Dodecil Solfato
SDS-PAGE	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di Sodio Dodecil Solfato
SGs	Granuli di Stress
SLA	Sclerosi Laterale Amiotrofica
sSLA	forma sporadica di SLA
fSLA	forma familiare di SLA
SMA	Atrofia Muscolare Spinale
SMNs	Motoneuroni spinali
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SOD	Superossido Dismutasi
Tc	Tetraciclina
TDP-43	Transactive response (TAR) DNA-binding Protein
TEM	Microscopio Elettronico a Trasmissione
Tet	Siero Fetale Bovino Tetraciclina-free
Ub	Ubiquitina
UPR	Sistema cellulare di Risposta alle Proteine Non ripiegate
UPS	Sistema Ubiquitina-Proteasoma
VAMP	Proteina di Membrana Associata alle Vescicole
VAPs	Proteine Associate alle Vescicole
VAPA	Proteina A di Membrana Associata alle Vescicole
VAPB	Proteina B di Membrana Associata alle Vescicole
Wt	Wild type
WTL	Wild type-like
7-AAD	7-Amino-Actinomicina-D

CAPITOLO 1: Introduzione

1.1 Le Malattie Neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono un gruppo eterogeneo di patologie che comprendono forme sporadiche e familiari e colpiscono specifiche aree del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Conducono alla selettiva, graduale e progressiva perdita delle cellule nervose, con conseguente perdita di una o più funzioni cerebrali (79, 239, 277). La maggior parte di queste malattie è correlata all'età, pertanto, rappresentano un crescente problema sanitario e socio-economico nei paesi industrializzati, dove la loro frequenza è aumentata negli ultimi decenni, insieme all'aspettativa di vita individuale (169). Le manifestazioni cliniche dipendono dai sistemi neuronali coinvolti nel corso della malattia e sono distinte in due gruppi: le *demenze*, definite come disordini cognitivi, associativi, caratteriali e di memoria e i *disordini del movimento*, caratterizzati da ipercinesia, acinesia e paralisi. I fattori ambientali, tra cui metalli pesanti, pesticidi e alimenti, sono stati largamente studiati come potenziali fattori di rischio nella neurodegenerazione (38), così come lo stress ossidativo e i danni mitocondriali, anche se il loro ruolo nel processo di degenerazione neuronale deve essere ancora del tutto chiarito (129).

Tra le malattie neurodegenerative che rivestono un ruolo importante, soprattutto per i quadri clinici che determinano, vi sono la Malattia di Alzheimer (AD), il Morbo di Parkinson (PD), la Malattia di Huntington (HD) e la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). Tali patologie potrebbero avere cause e meccanismi patogenetici comuni, quali il misfolding proteico, l'aggregazione e l'accumulo di proteine nel cervello e la conseguente morte neuronale per apoptosi. Per questi motivi vengono anche classificate come patologie da accumulo di proteine (**Fig. 1**).

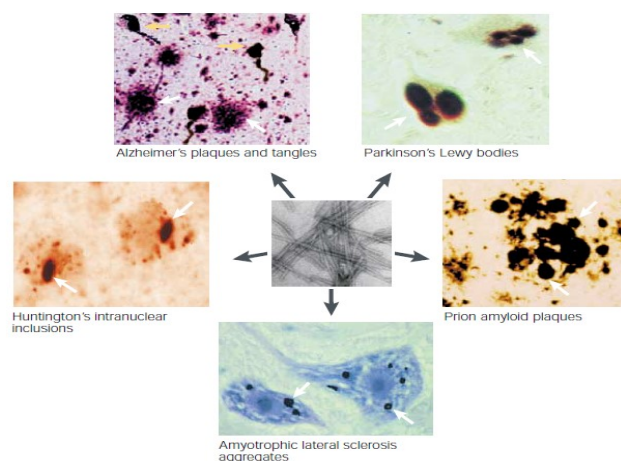


Fig. 1 Presenza di aggregati proteici nelle più comuni Malattie Neurodegenerative (fonte Soto 2003)

Anche il danno ossidativo, dovuto ad un alterato equilibrio redox cellulare, è considerato un fattore comune tra le malattie neurodegenerative, in quanto riscontrato a livello della componente lipidica, proteica e degli acidi nucleici in neuroni corticali e in cellule periferiche di pazienti affetti da AD e nei motoneuroni di soggetti affetti da SLA (270, 277). Tuttavia, nonostante siano stati condotti studi di associazione con il fenotipo della malattia, ad oggi non è ancora chiaro se lo stress ossidativo rappresenti il “*primum movens*” della degenerazione neuronale o se ne sia una diretta conseguenza. Sebbene le malattie neurodegenerative possano variare, l’esito finale è sempre gravemente invalidante: per la stragrande maggioranza di tali patologie non esistono terapie risolutive, se non la somministrazione di farmaci puramente sintomatici che, però, hanno mostrato finora scarsa efficacia.

1.2 La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) - conosciuta anche come “*Morbo di Lou Gehring*”, nome del famoso giocatore statunitense di baseball che ne fu colpito, o “*Malattia di Charcot*”, dal neurologo francese che la definì per primo alla fine dell’800 - è una malattia neurodegenerativa tipica dell’età adulta, caratterizzata dalla progressiva paralisi muscolare, causata dalla degenerazione dei motoneuroni della corteccia motoria, del tratto corticospinale e del midollo spinale (279).

I motoneuroni (MNs) sono le cellule specializzate del SNC responsabili della contrazione della muscolatura volontaria preposta, in primo luogo, al movimento, ma che presiede anche le funzioni vitali come la deglutizione, la fonazione e la respirazione. Pertanto, una degenerazione dei motoneuroni comporta la paralisi progressiva dei muscoli da loro innervati, risparmiando tuttavia le funzioni sensoriali, sessuali, sfinteriali e, nella maggior parte dei casi, anche quelle cognitive (30, 173).

La principale caratteristica della SLA è il coinvolgimento dei **motoneuroni superiori** (o centrali o I motoneurone) ed **inferiori** (o periferici o II motoneurone) in più regioni del tronco encefalico e del midollo spinale (**Fig. 2**). I primi originano nella corteccia cerebrale, si prolungano verso la periferia e raggiungono il midollo spinale (cosiddetta via piramidale o cortico-spinale), dove stabiliscono un contatto (sinapsi) con i MNs inferiori. Questi ultimi, partendo dalle corna anteriori del midollo spinale, si prolungano verso la periferia, raggiungendo i muscoli con i quali prendono contatto nella cosiddetta **placca neuromuscolare** (**Fig. 3**), (133).

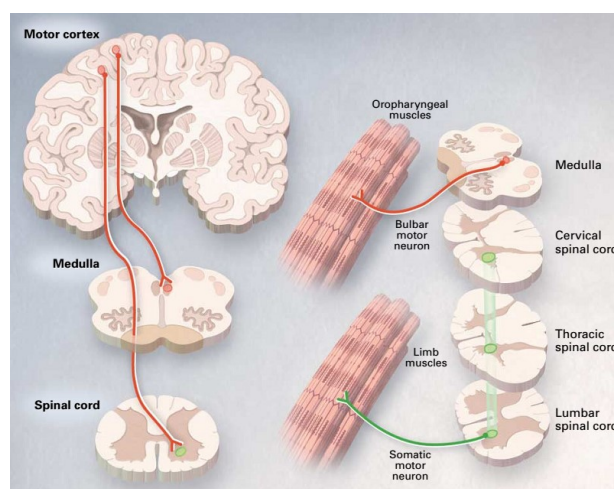


Fig. 2 Rappresentazione dei MNs superiori ed inferiori del tronco encefalico e midollo spinale (Rowland, Shneider, 2001)

Dal punto di vista clinico, il coinvolgimento dei MNs superiori compromette la funzionalità degli arti e conduce alla spasticità, alla debolezza e a vivaci riflessi tendinei profondi; mentre il coinvolgimento dei MNs inferiori causa fascicolazioni, atrofia e debolezza. Tuttavia, si evidenziano anche fatica nella deglutizione e difficoltà nell'articolazione della parola, fino alla perdita della capacità di comunicare verbalmente, quando la degenerazione coinvolge i MNs del tronco encefalico (281).

La SLA presenta una caratteristica che la rende particolarmente drammatica: pur bloccando progressivamente tutti i muscoli, non toglie la capacità di pensare e la volontà di rapportarsi agli altri. *La mente, infatti, resta vigile ma prigioniera in un corpo che diventa via via immobile.* Tuttavia, occorre precisare che, in una minoranza di casi, si possono avere alterazioni cognitive, per lo più di lieve entità, ma talora tali da configurare un quadro di demenza fronto-temporale. Questa forma di demenza è nettamente distinta dalla più frequente demenza di Alzheimer, in quanto si caratterizza prevalentemente per alterazioni del comportamento, piuttosto che compromissione di memoria o linguaggio.

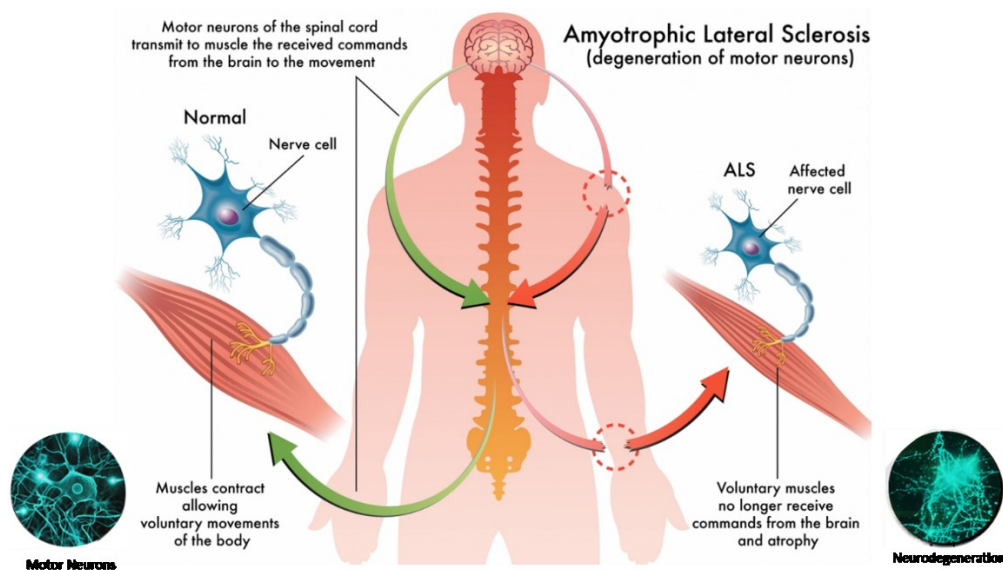


Fig. 3 Motoneuroni in condizioni fisiologiche e in caso di degenerazione, tipica della SLA (fonte SWISS Medical)

1.3 Epidemiologia

In quanto malattia neurodegenerativa tipica dell'età adulta, l'età media di insorgenza della SLA sporadica è di circa 60 anni, mentre si ha un esordio più precoce nei casi familiari. L'età è quindi considerata un fattore di rischio per la patologia. Numerosi studi di popolazione mostrano un picco di incidenza attorno ai 75 anni di età e successivamente il rischio si attenua fino a ridursi con l'avanzare dell'età. In generale, la malattia colpisce entrambi i sessi, anche se esiste una leggera prevalenza maschile (rapporto M/F circa 1.5:1), (281).

L'aspettativa di vita dopo la diagnosi è mediamente di 3-5 anni, nonostante il decorso della patologia presenti diverse manifestazioni cliniche in ogni paziente che ne è affetto.

Attualmente, l'**incidenza** della SLA nei paesi occidentali, ossia il numero di nuovi casi diagnosticati in un anno, è di 1.5-2.4 casi su 100.000 abitanti, con 3 nuove diagnosi ogni giorno. La **prevalenza**, ovvero il numero di pazienti che convive con la SLA, è in media 4-8 casi ogni 100.000 abitanti ed è in continuo aumento soprattutto grazie ai miglioramenti nella diagnosi della malattia, nell'assistenza e nelle condizioni di vita dei pazienti (281).

Incidenza e prevalenza sono relativamente uniformi nei paesi occidentali, anche se esistono focolai di frequenza più alta nel Pacifico occidentale (275). Tuttavia, ciò non risulta correlato all'appartenenza del paziente ad una specifica area geografica.

In Italia, si contano circa 6.000 pazienti affetti da SLA e ogni anno si registrano 1.000 nuovi casi (**Tab. 1**).

Incidenza	1,5-2,4 casi ogni 100.000 abitanti/anno
Prevalenza	4-8 casi ogni 100.000 abitanti
Malati in Italia	6.000
Nuovi casi ogni anno in Italia	1.000
Aspettativa media di vita	3-5 anni

Tab.1 Valori di incidenza e prevalenza della SLA nei paesi occidentali e in Italia (fonte arisla.org)

Per quanto concerne la regione Sardegna, secondo uno studio condotto dall' AISLA (*Associazione Italiana per la Sclerosi Laterale Amiotrofica*), la componente genetica della SLA nella popolazione sarda è molto più forte rispetto alla media europea e mondiale e ha caratteristiche peculiari. Infatti, studi epidemiologici non ancora conclusi (281), indicano che in Sardegna i tassi di incidenza e prevalenza sono 3-5 volte più alti rispetto alla media mondiale e nel Medio Campidano i valori di incidenza sono più elevati di 10-15 volte rispetto alla media sarda. I ricercatori ipotizzano che questi valori così elevati siano dovuti all'isolamento genetico della popolazione sarda, che ha favorito un aumento di frequenza di varianti geniche predisponenti la SLA.

1.4 L'Esordio della SLA

Per convenzione, la SLA viene distinta in due forme che, tuttavia, sono clinicamente indistinguibili (120):

- **Sporadica (sSLA)** (90-95% dei casi): non legata a trasmissibilità familiare. Nella maggior parte dei casi sporadici non è ancora stata identificata alcuna causa genetica;
- **Familiare (fSLA)** (5-10% dei casi): caratterizzata da una componente genetica familiare e legata a mutazioni di geni causativi della malattia. I casi fSLA sono geneticamente eterogenei, ma più del 20% è associato a mutazioni del gene che codifica per la Superossido Dismutasi 1 a rame e zinco (Cu/Zn SOD1). Tali mutazioni sono anche responsabili del 1.5% dei casi sSLA, suggerendo quindi un possibile ruolo della proteina in entrambe le forme della malattia (202, 220). Numerose evidenze suggeriscono che mutazioni della SOD1 sono significative nella patogenesi della SLA e contribuiscono alla degenerazione dei motoneuroni, non tanto per una riduzione dell'attività enzimatica ma, piuttosto, per l'acquisizione di proprietà neurotossiche pro-ossidanti e apoptotiche. Il meccanismo con cui ciò si verifica è ancora oggi oggetto di studio. Invece, circa il 2-5% dei casi fSLA presenta mutazioni del gene TARDBP e circa il 25% di essi presenta un'espansione nucleotidica del gene C9ORF72. Le mutazioni di questi ultimi due geni hanno dimostrato una correlazione anche con alcune forme di demenza fronto-temporale, creando un continuum tra le due patologie.

I fattori genetici che condizionano l'esordio e la severità dei casi sSLA non sono stati ancora del tutto delucidati.

Complessivamente, le manifestazioni cliniche delle due forme, sSLA e fSLA, sono simili, sebbene l'età di esordio nella forma familiare risulti generalmente anticipata di circa dieci anni rispetto alla forma sporadica.

Come spesso accade in numerose malattie, anche non di origine neurologica, la SLA si presenta con sintomi aspecifici. La malattia avanza silenziosamente e si manifesta quando la perdita progressiva dei MNs supera la capacità di compenso dei MNs supersiti. Questo processo può avvenire anche nell'arco di diversi anni e, al momento, non si può arrestare. Iniziano così i primi sintomi della malattia, che comprendono crampi, rigidità, lentezza e debolezza muscolare a carico di un braccio o di una gamba; difficoltà respiratorie e nella deglutizione; disturbi nella fonazione fino al cosiddetto tono nasale. Questi sintomi evolvono poi in forme di debolezza generalizzata sempre più evidente, con successiva paralisi della muscolatura volontaria e compromissione dei muscoli respiratori, che impone la necessità della ventilazione assistita. La morte del paziente sopraggiunge entro 1 o 5 anni dall'esordio dei sintomi. Le parti del corpo interessate dai sintomi iniziali della patologia dipendono dai muscoli che vengono danneggiati per primi.

In base al tipo di esordio, la SLA può essere distinta in due forme:

- **Spinale** (circa due terzi dei pazienti con SLA): con *"esordio all'arto"*, in cui sono compromessi i MNs del midollo spinale. Tale forma è caratterizzata da sintomi legati alla debolezza muscolare e all'atrofia focale, in cui i sintomi iniziali possono essere distali o prossimali agli arti superiori e inferiori. A poco a poco, gli arti atrofici possono sviluppare spasticità, che compromette l'abilità manuale e l'andatura del paziente. Infatti, in alcuni casi, i sintomi iniziali riguardano una gamba e i pazienti accusano anomalie e difficoltà durante la corsa o la camminata. In altri casi, i pazienti presentano i primi sintomi della malattia su una mano o su un braccio e hanno difficoltà ad eseguire compiti semplici che richiedono destrezza manuale, come abbottonare una camicia, scrivere o girare una chiave in una serratura.

- **Bulbare** (circa un terzo dei pazienti con SLA): con “*esordio bulbare*”, in cui la lesione è correlata alla degenerazione dei MNs del tronco cerebrale. In questo caso, la malattia è caratterizzata da disartria e disfagia per alimenti solidi o liquidi o entrambi e i sintomi degli arti, nella maggior parte dei casi, si verificano entro i primi 2 anni. Spesso è presente un’affaticabilità dei muscoli della masticazione che, insieme alla disfagia, è spesso responsabile di dimagrimento e malnutrizione. Per questi motivi, risulta necessario un intervento per impianto PEG.

Questa distinzione puramente di carattere clinico, basata sul tipo di esordio dei sintomi, è utile per definire la comparsa della malattia. Tuttavia, essa non appare sempre così netta poiché le due forme possono, in alcuni casi, sovrapporsi (281).

1.5 La Progressione della SLA

La progressione clinica della patologia, così come i sintomi all’esordio e la gravità, possono variare notevolmente da un paziente all’altro, perché i muscoli colpiti, la velocità di peggioramento e l’entità della paralisi possono essere diversi. In genere, si osserva una progressiva perdita delle capacità di movimento, fino alla completa immobilità e, a volte, possono anche essere compromesse la masticazione, la deglutizione e la capacità di fonazione. Gradualmente, si manifesta nel soggetto una paralisi respiratoria, a cui si può ovviare solo attraverso la ventilazione meccanica. Anche nelle fasi più avanzate, la malattia colpisce soltanto il sistema motorio e risparmia tutte le altre funzioni neurologiche. La SLA, infatti, non compromette gli organi interni (cuore, reni, fegato) né i cinque sensi (vista, udito, olfatto, gusto e tatto). Raramente sono affetti i muscoli che controllano i movimenti oculari e quelli degli sfinteri esterni di intestino e vescica. Le funzioni sessuali sono preservate e, nella maggior parte dei casi, non vengono coinvolti né il pensiero né le attività mentali (22, 52).

La complessità nella gestione di una persona affetta da SLA richiede la presenza di un team multidisciplinare di professionisti, che ha il compito di prendersi cura non solo degli aspetti diagnostici e di assistenza clinica in tutte le fasi della malattia, ma anche di prendersi in carico del sistema familiare e dei caregiver.

A tal fine sono necessarie competenze e funzioni differenti ed integrate: dal medico di base, al neurologo, neurofisiologo, fisiatra, pneumologo, rianimatore, gastroenterologo, psicologo, dietista, ortofonista, fisioterapista, fisioterapista esperto in ausili, infermieri particolarmente formati, assistente sociale. La gestione della malattia è principalmente di supporto, palliativa, tuttavia, grazie all'importante sviluppo degli ausili tecnologici, alla maggiore consapevolezza dei bisogni dei pazienti e al sorgere di centri clinici specializzati, nel corso degli anni la qualità di vita dei pazienti è notevolmente migliorata.

1.6 Eziologia

Sebbene in questi anni siano stati realizzati importanti progressi nella comprensione dell'eziopatologia, la SLA rimane ancora una malattia per molti aspetti sconosciuta. I meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo della SLA sono molteplici e multifattoriali, e prevedono una complessa interazione tra fattori genetici, ambientali (metalli pesanti, pesticidi, insetticidi, fumo di sigaretta) e molecolari (228, 243), (**Fig. 4**). In particolare, le principali ipotesi patogenetiche riguardanti la neurodegenerazione sono:

- il danno eccito-tossico legato al glutammato, un amminoacido utilizzato dai neuroni come segnale chimico e il cui eccesso può essere nocivo;
- i radicali liberi e lo stress ossidativo;
- gli aggregati citoplasmatici di proteine alterate nella loro struttura;
- le disfunzioni mitocondriali, ossia le alterazioni delle “centrali energetiche” delle cellule;
- l'alterazione dei processi di trasporto assonale, ossia il trasporto di molecole lungo la cellula motoneuronale;
- l'aberrante attivazione della microglia, ossia l'infiammazione del sistema nervoso;
- la carenza dei fattori di crescita, preposti alla crescita e al funzionamento dei motoneuroni.

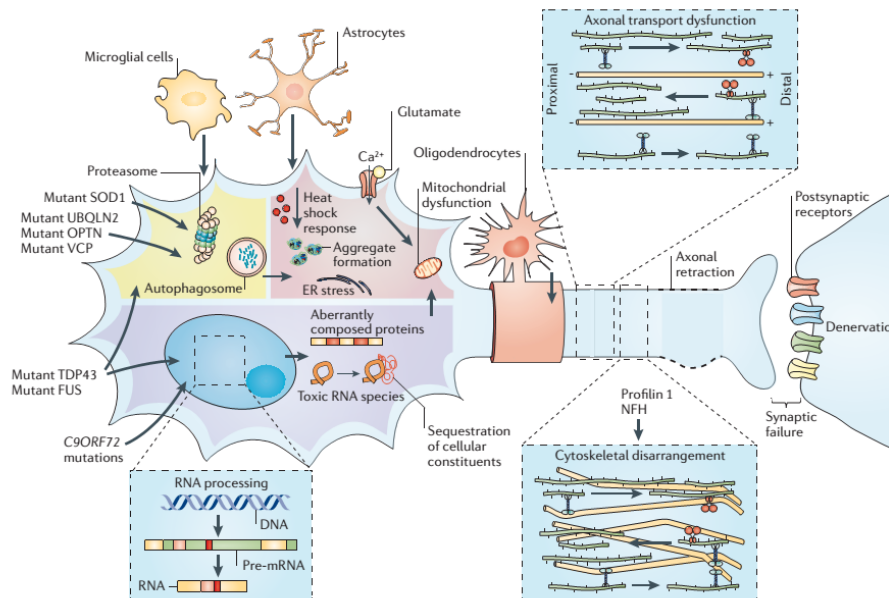


Fig. 4 Panoramica degli eventi nella patogenesi della SLA (fonte: Robberecht and Philips 2013)

1.6.1 Fattori Ambientali

Numerosi studi, ad oggi non ancora conclusi, hanno come oggetto di indagine l'ipotesi che esistano differenti fattori ambientali, come metalli pesanti o pesticidi, in grado di causare una progressiva degenerazione dei MNs. Poiché, come già affermato, i casi di sSLA rappresentano approssimativamente il 90% dei casi di SLA, è stato ipotizzato che l'esposizione a tali fattori ambientali potrebbe interagire con la suscettibilità genetica individuale, mostrando così un ruolo chiave nella patogenesi della malattia. È stata avanzata l'ipotesi che il fumo di sigaretta e molti componenti chimici possano contribuire all'insorgenza della SLA attraverso perossidazione lipidica (105, 228). In secondo luogo, sembra che lo stile di vita di un individuo, così come lo stato occupazionale, possa essere associato all'insorgenza della SLA per la continua esposizione ad agenti tossici. In particolare, il consumo di cibo contenente elevate concentrazioni dell'amminoacido neurotossico β -metilamino-L-alanina (62), l'uso di farmaci che riducono il colesterolo (110) e l'esposizione a metalli pesanti (141), pesticidi o erbicidi (42, 243) potrebbero essere considerati potenziali fattori di rischio per la SLA. Importanti studi caso-controllo e studi sperimentali rivelano che l'esposizione a tutte queste sostanze tossiche potrebbe provocare un danno cerebrale

progressivo, attraverso l'incremento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS) (26), una ridotta attivazione degli astrociti con effetti neuroprotettivi (18) e l'inibizione dell'acetilcolinaesterasi, risultando quindi in un'eccessiva stimolazione dei recettori colinergici e successiva eccitotossicità (49). Inoltre, anche l'esercizio fisico intenso, prolungato ed estenuante di calciatori professionali ed amatoriali (Italian and English soccer players; 51, 271), così come l'esercizio fisico militare (Gulf War veterans in the US Army; 145) potrebbero rappresentare un fattore di rischio per la SLA, in quanto entrambi correlati all'ipossia occupazionale intermittente, che risulta poi in un'intensa produzione di ROS (263), o ai continui e ripetuti traumi alla testa (47).

In breve, fino ad oggi è stata proposta una lunga lista di potenziali fattori di rischio ambientali per la SLA (Tab. 2), ma ancora non esiste un rapporto causale accertato tra questi fattori e la patogenesi della malattia (254).

Proposed Risk Factor	Level of Increased Risk	Strength ⁶² and Type of Evidence	Proposed Mechanisms	References
Male gender	OR, 1.5	Level A	Early testosterone exposure	4
Smoking	OR, 1.1	Level A	Oxidative stress Lead Other toxins	63
US military service	OR, 0.22 to SMR, 1.92	Level B	Multiple	29
Lead	OR, 1.81	Level B	Neurotoxicity	42
Pesticides	OR Men, 1.88 Women, 1.31	Level B	Neurotoxic	51
Physical activity (or predilection thereof)	Unknown	Level U	Physical fitness, early testosterone exposure	43,44
Head trauma	Unknown	Level U	Direct neuronal injury	64
Electromagnetic radiation	Unknown	Level U	Electromagnetic field	37
Low body mass index	Unknown	Level U	Higher metabolism	45
Statin treatment	Unknown	Level U	Altered lipid metabolism	47
BMAA	Unknown	Level U	Neurotoxicity	17,18

Tab. 2 Fattori di rischio ambientali della SLA (fonte: Oskarsson 2015)

Recentemente, è emerso anche il coinvolgimento di fattori epigenetici nella progressione di molte malattie neurodegenerative, tra cui la SLA stessa. Le modificazioni epigenetiche potrebbero dimostrare un possibile legame tra fattori di rischio ambientali ed alterazioni dell'espressione genica, responsabili dell'esordio della SLA (174). Infatti, il silenziamento epigenetico di geni indispensabili per il corretto funzionamento dei MNs potrebbe essere alla base della progressione della patologia. A supporto di tale ipotesi, è stato dimostrato che il trattamento con inibitori per gli enzimi istone-deacetilasi (HDAC) prolunga significativamente la sopravvivenza, migliora il funzionamento dei MNs e riduce la perdita di MNs in modelli murini di SLA (221, 223).

1.6.2 Fattori Genetici

Sebbene ancora oggi non siano state identificate le eventuali cause genetiche della SLA, negli ultimi anni c'è stato un rapido progresso sulle cause e sui principali meccanismi patogenetici della malattia, attraverso ricerche e studi riguardanti forme familiari di SLA (10% dei casi totali) (40), (**Fig. 5**). Dal 1993 si registra un notevole incremento di conoscenze sui meccanismi molecolari e cellulari alla base della SLA, soprattutto con la scoperta di mutazioni nel gene codificante la SOD1, che caratterizzano circa il 20% dei casi di fSLA (216). Tali mutazioni sono ereditate in modo autosomico dominante (73). Successivamente, differenti loci genici sono stati correlati alla fSLA e numerosi geni causativi sono stati identificati (77), (**Tab. 3**). Tra questi ci sono *ALSIN*, che funziona come fattore di scambio per una piccola GTPasi cellulare che regola il traffico degli endosomi (287); *VAPB*, che codifica per la proteina B associata alle proteine di membrana delle vescicole cellulari (190); *SETX*, gene codificante una DNA/RNA elicasi (50); *ANG*, che causa una riduzione dell'attività neuroprotettiva contro il danno da ipossia (115) e *DCTN1*, codificante una componente del complesso delle dineine che costituisce il maggiore "motore" retrogrado assonale (210). Nel 2006 (10) venne identificata la *transactive response (TAR) DNA-binding proteina (TDP-43)* di 43 kDa come principale componente di aggregati di proteine ubiquitinate, evidenziati in pazienti con sSLA. Inoltre, mutazioni dominanti nel gene TARDBP sono state descritte da numerosi gruppi di ricerca come causa primaria del 3% di SLA familiare e 1.5% di casi sporadici (58, 138).

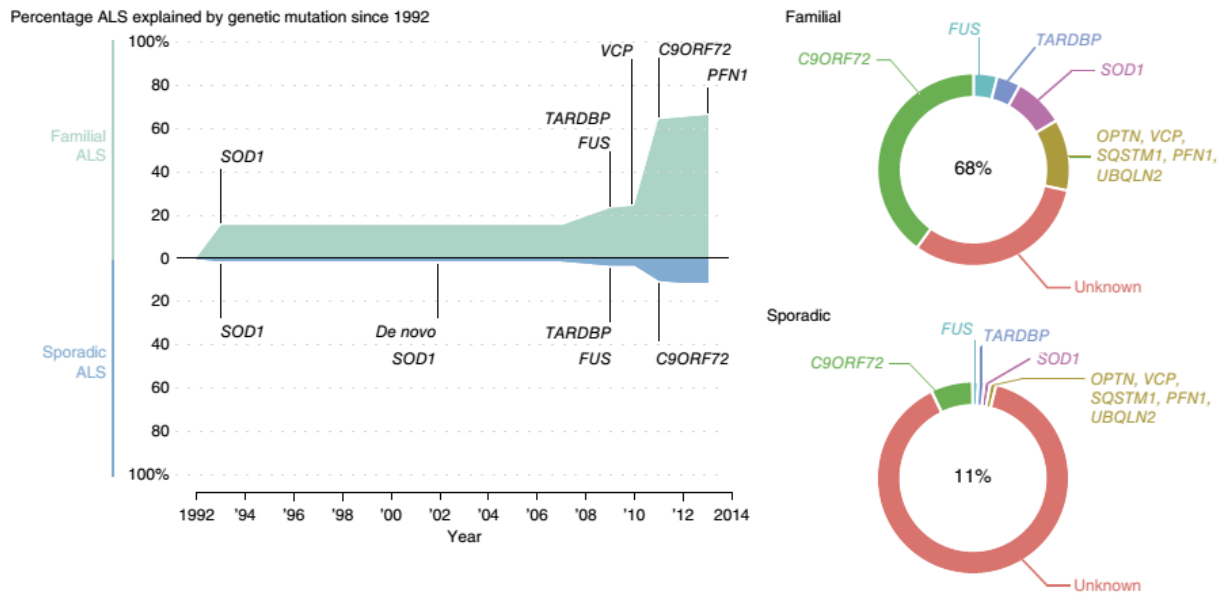


Fig. 5 Cronologia delle scoperte genetiche nelle forme di SLA familiare e sporadica. I valori rappresentano la proporzione di casi di SLA nella popolazione europea, indotti da mutazioni dei geni causativi (fonte: Renton 2014)

In generale, fino ad oggi sono stati identificati più di 20 geni le cui mutazioni sono coinvolte nello sviluppo della SLA. Tuttavia, tali mutazioni, sono state riscontrate anche in soggetti che, nel corso della loro vita, non hanno mai sviluppato la SLA, per un fenomeno che viene denominato “penetranza incompleta”. Questo significa che le mutazioni geniche in questione possano contribuire allo sviluppo della malattia, come fattori predisponenti.

Studi di linkage hanno evidenziato che le mutazioni geniche associate alla SLA possono essere ereditate sia in modo autosomico dominante che in modo recessivo ed entrambi i tipi di eredità sono associati a più di un’entità genetica. La relazione tra varianti genetiche e manifestazioni patologiche e fenotipi clinici è diventata oggi più chiara. Sebbene in molti casi la funzione delle proteine mutate non sia stata ancora identificata o molte differenti funzioni siano state associate ad esse, i dati disponibili mostrano che le proteine presenti nei casi di fSLA sono coinvolte in molteplici processi cellulari, che vanno dal processamento del RNA alla risposta antiossidante, dal trasporto assonale e vescicolare all’angiogenesi (61, 131) e le mutazioni di queste proteine possono danneggiare in modo irreversibile il funzionamento cellulare.

Gene	Protein	Function	Inheritance	Phenotype(s)	%FALS ²	%SALS ²
ALS2 ¹ (108)	Alsln	Rho guanine nucleotide exchange factor	AR	Juvenile ALS, Juvenile PLS, HSP		
ANG; ALS9 (109–110)	Angiogenin	Ribonuclease; angiogenesis	AD/Sporadic	ALS, PD		
ATXN2; ALS13 (111–112)	Ataxin-2	RNA processing	Not established	ALS, SCA2, parkinsonism		
CHCHD10 (113–114)	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	Mitochondrial protein	AD	FTD, cerebellar ataxia, myopathy		
CHMP2B; ALS17 (115)	Chromatin modifying protein 2B	Recycling/degradation of cell surface receptors	AD	ALS, ALS-FTD, FTD		
C9ORF72 (21–22, 116–117)	Chromosome 9 open reading frame 72	Unknown	AD	ALS, ALS-FTD, FTD, parkinsonism (rare), Psychosis	40	7
DAO (118)	D-amino-acid oxidase	Peroxisomal enzyme; potential role in glutamatergic neurotransmission	AD	ALS		
DCTN1 (119–121)	Dynactin	Axonal transport	AD	PMA, FTD, HMN VIIB, Perry Syndrome		
FIG4; ALS11 (122)	SAC1 lipid phosphatase domain containing (S. cerevisiae)	Polyphosphoinositide phosphatase	AD, AR	ALS, PLS, CMT4J, Yunis-Varon Syndrome		
FUS; ALS6 (33, 68)	Fused in sarcoma	RNA-binding protein, DNA repair, exon splicing	AD	ALS, Juvenile ALS, FTD	4	1
HNRNPA1; ALS20 (83)	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1	mRNA processing, transport and metabolism	AD	ALS, FTD, IBMPFD		
HNRNPA2B1 (83)	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2B1	mRNA processing, transport and metabolism	AD	ALS, FTD, IBMPFD		
MATR3; ALS21 (82)	Matrin 3	Nuclear matrix protein, may stabilize mRNA species	AD	ALS, distal myopathy 2, ALS plus myopathy		
OPTN; ALS12 (123)	Optineurin	Membrane and vesicle trafficking, transcription activation	AD, AR	ALS, Progressive open angle glaucoma	<1	<1
PFN1; ALS18 (124)	Profilin 1	Actin binding protein, actin polymerization	AD	ALS	<1	<1
SETX; ALS4 (125)	Senataxin	RNA/DNA helicase	AD	Onset < age 25 years; SETX mutation causes Spinocerebellar ataxia 1/ataxia-ocular apraxia 2		
SIGMAR1; ALS16 (126–128)	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	Endoplasmic reticulum chaperone protein; proteasome inhibition, mitochondrial stress	AR	ALS, FTD		
SOD1; ALS1 (3, 54–55)	Superoxide dismutase 1	Oxidative stress	AD, AR, de novo	ALS, FTD (rare), PMA	12	2
SPG11 (129–130)	Spatascin	DNA damage repair	AR	Juvenile ALS, HSP (SPG11)		
SQSTM1 (131–132)	Sequestosome 1	Scaffold protein, NFkB signaling	AD	ALS, FTD	1	<1
TARDBP; ALS10 (62–64)	TAR DNA binding protein 43	Transcriptional repressor, splicing regulation	AD, AR, de novo	ALS, FTD, PD	4	1
TBK1 (89–90)	TANK-Binding Kinase 1	Mediates growth factor activation of NFkB	AD	ALS		
TUBA4A; ALS22 (133)	Tubulin Alpha 1	Structural component of cytoskeleton; GTP binding	AD	Spinal onset ALS, ALS-FTD, FTD		
UBQLN2; ALS15 (81, 88)	Ubiquilin 2	Ubiquitination, protein degradation	XLD	ALS, FTD	<1	<1
VAPB; ALS8 (134)	Vesicle-associated membrane associated-protein B	Vesicular trafficking	AD	ALS, PMA		
VCP; ALS14 (91)	Valosin-containing protein	ATP-binding protein, vesicle transport and fusion	AD	ALS, ALS-FTD, FTD, IBMPFD	1	1

Tab. 3 Geni correlati alla patogenesi della SLA (fonte Boylan 2015)

1.6.3 Superossido Dismutasi 1 (Cu/Zn SOD1)

1.6.3.1 Struttura e Funzioni

Le Superossido Dismutasi (SOD) appartengono alla classe delle ossidoreduttasi e hanno una funzione antiossidante in quasi tutte le cellule dell'organismo esposte all'ossigeno. Sono ubiquitarie e rappresentano una frazione rilevante di tutte le proteine cellulari, in particolare nel sistema nervoso (197, 217). Il loro ruolo è di detossificare le cellule dagli anioni superossido (O_2^-), generati soprattutto dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale. In particolare, la SOD catalizza le reazioni di dismutazione, in cui l'anione superossido è convertito dapprima in perossido di

idrogeno e successivamente in molecole non tossiche per la cellula, quali acqua ed ossigeno (**Fig. 6**). Pertanto, dato il ruolo delle Superossido Dismutasi nei meccanismi di difesa contro gli agenti ossidanti, esse sono considerate tra gli enzimi più importanti per le cellule.

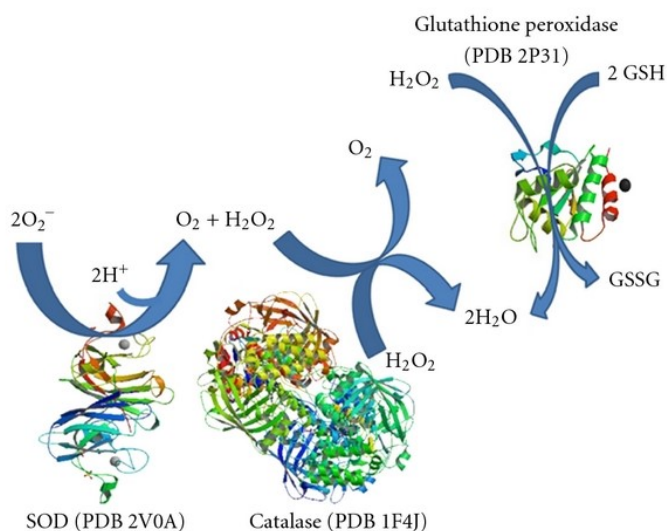


Fig. 6 Reazioni catalizzate dalla SOD, catalasi e glutatione perossidasi. In un primo momento, la SOD converte O_2^- a O_2 e H_2O_2 e successivamente la catalasi e la glutatione perossidasi convertono H_2O_2 in acqua (fonte: Melo 2011)

Esistono molte forme comuni della SOD e possono avere diversi co-fattori come Rame e Zinco, o Manganese, o Ferro, o Nichel. Nell'uomo sono presenti tre forme di Superossido Dismutasi: la SOD1, proteina dimerica localizzata nel citoplasma cellulare, e le SOD2 e SOD3, proteine tetrameriche presenti rispettivamente nei mitocondri e nell'ambiente extracellulare. La SOD1 e la SOD3 contengono Rame e Zinco al centro del sito attivo, mentre la SOD2 contiene Manganese. I geni che codificano tali proteine sono localizzati rispettivamente nei cromosomi 21, 6 e 4 (21q22.1, 6q25.3 e 4p15.3-p15.1), (91).

In particolare, la Superossido Dismutasi 1 a rame e zinco (Cu/Zn SOD1) è una metallo-proteina omodimerica di 32kDa e 153 residui amminoacidici, codificata da un gene situato sul braccio lungo del cromosoma 21 (21q22.1), (**Fig. 7**). È localizzata principalmente nel citoplasma cellulare, ma è presente anche nello spazio intermembrana mitocondriale, nel nucleo e nei perossisomi.

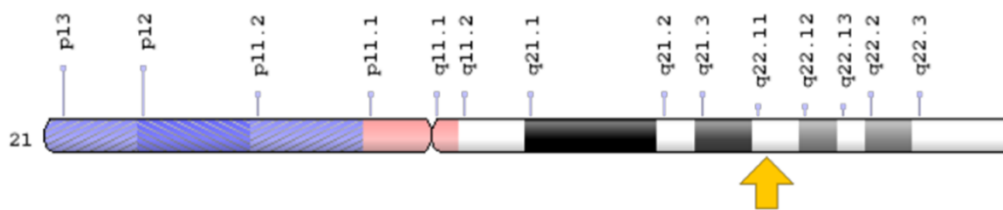


Fig. 7 Localizzazione cromosomica del gene SOD1 sul braccio lungo (q) del cromosoma 21, in posizione 22.11 (fonte: Genetics Home Reference)

La SOD1 è una proteina abbondante nel SNC e costituisce circa l'1% delle proteine cerebrali, tuttavia è espressa ubiquitariamente in tutti i tessuti (197, 231). Ciascuna subunità della SOD1 è formata da 8 foglietti β antiparalleli connessi da 3 loops esterni e contiene un sito attivo che lega uno ione Rame, coordinato a quattro residui di istidina (His 46, His 48, His 63, His 120), uno Zinco coordinato a tre residui di istidina e un aspartato (His 63, His 71, His 80, D 83) e un ponte disolfuro (**Fig. 8a**). I due ioni, Rame e Zinco, sono vicini tra loro e sono collegati da un anello imidazolico di un residuo di istidina (260). Solo il Rame svolge l'attività catalitica, mentre lo Zinco serve a stabilizzare l'intera struttura proteica. La proteina correttamente ripiegata ed enzimaticamente attiva è il risultato di differenti modificazioni post-traduzionali, quali l'acquisizione degli ioni Zinco e Rame, la dimerizzazione delle subunità e la formazione di un ponte disolfuro intracatena tra cisteina 57 e 146 (**Fig. 8b**). La presenza di tutte queste modificazioni induce gli studiosi a focalizzare l'attenzione sulle mutazioni della SOD1 che possono interferire nel processo di maturazione della proteina.

L'enzima SOD1 ha la funzione di neutralizzare i radicali superossido, che possono creare danni alla cellula se prodotti in quantità non controllate. In condizioni fisiologiche, l'anione superossido è prodotto a bassi livelli durante i processi metabolici cellulari, specialmente nelle reazioni di sintesi dell'energia nei mitocondri. A volte, però, si può verificare un'iperproduzione di questi radicali, che induce tossicità cellulare, con mutazioni nel DNA e danni a proteine ed altre molecole essenziali per le cellule. Tale tossicità può essere ridotta dall'azione dei sistemi di difesa cellulari, soprattutto enzimatici, tra i quali la stessa SOD1, che trasforma il superossido in molecole meno pericolose, come ossigeno e acqua (16, 77, 261).

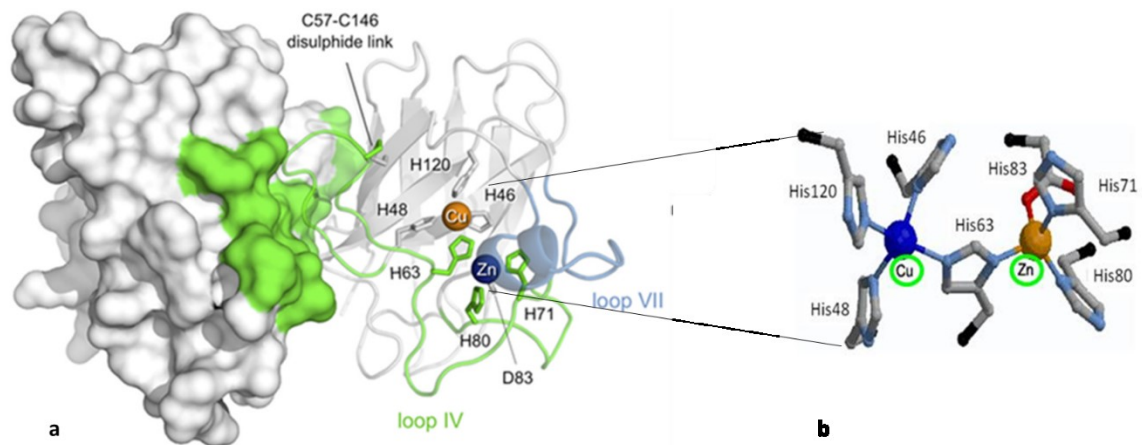


Fig. 8 a) Struttura della proteina dimerica SOD1. Nella forma nativa, i loops IV e VII si ripiegano a formare una struttura altamente compatta ed ordinata attorno al sito attivo dell'enzima, in cui il IV forma anche parte dell'interfaccia del dimerico (porzione verde). Il monomero a sinistra è mostrato come superficie accessibile, mentre il monomero di destra rappresenta schematicamente la struttura della proteina. **b)** Sito attivo della SOD1 in cui sono evidenti i residui amminoacidici che coordinano il legame tra gli ioni Cu e Zn all'interno del sito attivo (fonte: Danielsson 2011)

1.6.3.2 Mutazioni della SOD1 nella SLA 1

Circa il 20% dei casi di fSLA e l'1-4% di sSLA presentano mutazioni nel locus ALS1 sul cromosoma 21, che codifica per la SOD1. Nel 1993 è stata identificata la prima mutazione del gene correlata a casi di SLA che consiste nella sostituzione amminoacidica di una glicina in posizione 93 con un residuo di alanina (G93A). Successivamente, sono state identificate più di 150 differenti mutazioni a carico di tutti i cinque esoni del gene per la SOD1 e sono prevalentemente mutazioni missenso (5,6). Tuttavia, esistono, anche se in minima percentuale, mutazioni non-senso e delezioni che producono proteine tronche e mutazioni nelle regioni non codificanti del gene e che preannunciano aberranti meccanismi di splicing. Alcune mutazioni sono localizzate in siti essenziali per il corretto ripiegamento e la stabilità della proteina, altre riguardano il sito attivo o sono localizzate nell'interfaccia del dimerico e, altre ancora, dentro le catene β o nei loops di connessione. Tutte queste mutazioni sono distribuite sull'intera sequenza genica e, in particolare, sugli esoni 4 e 5 (257), (**Fig. 9**). La maggior parte di queste mutazioni sono dominanti, eccetto le mutazioni N86S e D90A, che sono ereditate in forma recessiva (216, 258), sebbene siano state descritte solo in casi rari di SLA ad esordio giovanile.

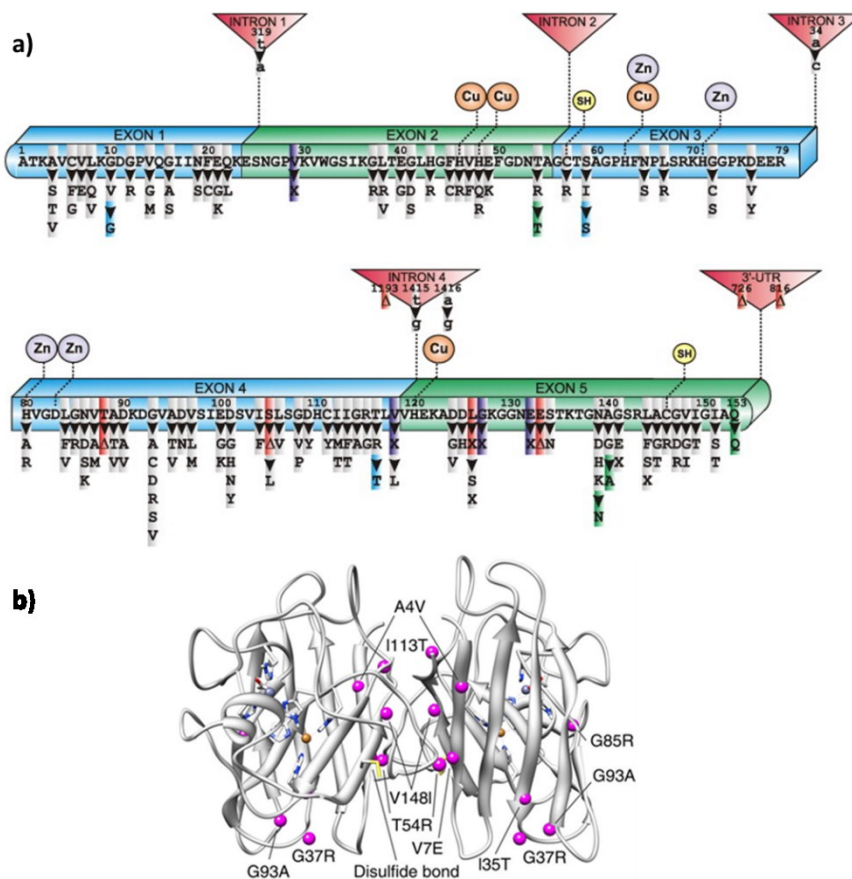


Fig. 9 a) Localizzazione delle principali mutazioni sul gene SOD1 nella fSLA e b) corrispondenti alterazioni strutturali della proteina (fonte: Luchinat 2014)

Studi sulla SOD1 ricombinante hanno mostrato che le mutazioni associate alla SLA possono essere distinte in due classi. La prima classe include le mutazioni che determinano le SOD1 “wild type-like” (WTL), che conservano la capacità di legare Rame e Zinco, la normale attività e una struttura simile a quella nativa, con solo alcune lievi modificazioni alla struttura secondaria. Contrariamente, la seconda classe di mutazioni della SOD1 comprende mutazioni nella regione che lega i metalli (MBR), con conseguente carenza di Rame e Zinco, destabilizzazione termica e un disordine strutturale nei loops adiacenti al sito attivo (252). Le mutazioni G93A e H80R della SOD1 appartengono rispettivamente alle due classi di mutazioni descritte sopra. Purtroppo, ancora non esiste una correlazione tra mutazione genetica, attività enzimatica, progressione clinica e fenotipo della malattia (284). Infatti, i casi di SLA associati alle mutazioni della SOD1 mostrano un’ampia varietà nel fenotipo, età di esordio, severità, tasso di progressione e durata della malattia.

Esistono pazienti che presentano la mutazione missenso A4V (la più comune in Nord America), che hanno una sopravvivenza breve, con morte in meno di un anno dalla diagnosi e coinvolgimento limitato del motoneurone superiore (65); mentre pazienti caratterizzati dalla mutazione D90A (la più comune a livello mondiale e nei casi sporadici) manifestano una malattia non penetrante e a lenta progressione. Sorprendentemente, nel Nord della Scandinavia, il 2-3% della popolazione è eterozigote per la mutazione D90A della SOD1, che è associata ad un polimorfismo benigno (4). Nonostante ciò, individui omozigoti per la D90A in quella regione sviluppano una malattia del motoneurone a lenta progressione con marcati segni corticospinali e una sopravvivenza prolungata di un decennio. Al contrario, i pazienti eterozigoti per D90A al di fuori di questo pool genetico sviluppano una SLA classica con un tempo di sopravvivenza di 3-5 anni (5). È importante sottolineare che alcune mutazioni della SOD1 possono rimanere asintomatiche, suggerendo che non tutte le mutazioni SOD1 causano l'esordio della SLA e sono piuttosto polimorfiche.

Il fenotipo clinico associato ad una certa mutazione a carico del gene SOD1 non dipende solo dalla mutazione stessa ma potrebbe essere anche influenzata dal background genetico del paziente, così come dai fattori ambientali circostanti (122).

Poiché oggi non esiste ancora una chiara spiegazione di come le mutazioni a carico del gene SOD1 causino SLA, sono state avanzate diverse ipotesi sulle funzioni tossiche acquisite dalla SOD1 mutata.

La prima ipotesi è che tali mutazioni potrebbero alterare l'attività enzimatica della SOD1, così da provocare un aumento dei livelli di ROS, stress ossidativo e morte neuronale.

Inoltre, risultati ottenuti da modelli sperimentali *“in vivo”* e *“in vitro”* hanno fornito evidenze a favore di una nuova ipotesi, che consiste nell'acquisizione di nuove funzioni tossiche nei motoneuroni. Infatti, è stato dimostrato che l'iper-espressione della SOD1 mutata *WTL* in modelli cellulari induce apoptosi nei neuroni (199) e che topi knockout per tale mutazione non sviluppano la malattia del motoneurone (212). Sembra che, contrariamente alla sua funzione fisiologica, la SOD1 mutata agisca come perossidasi utilizzando, come substrato, il perossido di idrogeno prodotto durante la convenzionale reazione di dismutazione. Così la SOD1 catalizza la reazione inversa alla dismutazione e il Rame ridotto utilizza il perossido di idrogeno per produrre radicali idrossilici (125, 288). Questi ultimi inattivano la SOD1, in quanto sono capaci di ossidare l'anello imidazolico del residuo di istidina al quale è legato il Rame.

In aggiunta a ciò, la tossicità della SOD1 mutata può risiedere anche nella sua *abilità di reagire con il perossinitrito*, causando la nitratura di residui di tirosine delle proteine cellulari. Infatti, sia il perossinitrito sia i radicali idrossilici sono fortemente reattivi e possono causare danni ossidativi a proteine, lipidi e DNA. In particolare, possono alterare la conformazione proteica e distruggere il sito attivo dell'enzima SOD1, modificare le proprietà delle membrane cellulari, mediante l'ossidazione degli acidi grassi insaturi, e indurre mutazioni nel DNA cellulare (19).

Un'altra ipotesi che spiegherebbe la tossicità della SOD1 mutata nella SLA, ma anche in altre malattie neurodegenerative, è rappresentata dalla formazione di aggregati citoplasmatici di proteine mal-ripiegate (25). Sembra, infatti, che la SOD1 mutata non riesca a piegarsi correttamente e quindi vada incontro ad un mal-ripiegamento conformazionale e conseguente aggregazione. Questi aggregati, a loro volta, potrebbero portare alla morte cellulare attraverso l'acquisizione al loro interno di altre proteine essenziali per la sopravvivenza dei neuroni, all'ostruzione del sistema ubiquitina-proteasoma, alla distruzione degli chaperoni molecolari o ad alterazioni di mitocondri, citoscheletro e/o trasporto assonale (251). Inoltre, la SOD1 mal-ripiegata potrebbe consentire l'accesso di substrati anomali, come il perossinitrito, nel suo sito catalitico, portando così alla nitratura di residui di tirosine (21). L'ipotesi degli aggregati è particolarmente interessante data la loro frequente presenza durante la malattia. Topi transgenici per la SOD1 mutata, infatti, presentano aggregati della SOD1 sia nei motoneuroni che negli astrociti e tali aggregati diventano sempre più evidenti via via che la malattia progredisce (39, 232).

Le attuali conoscenze propongono un meccanismo multisteps nella formazione degli aggregati di SOD1, che prevede monomerizzazione, de-metallazione ed oligomerizzazione della proteina stessa (146). Infatti, sembra che, quando presente, la SOD1 difettosa formi aggregati tossici per il motoneurone e diminuisca la sua presenza nel nucleo della cellula nervosa, causando una maggiore sensibilità del DNA ai danni provocati dagli agenti ossidanti e dai radicali liberi. Appare evidente quindi che, contrariamente a quanto si credeva finora, le mutazioni del gene SOD1 non causano solo fenomeni di neurotossicità a livello citoplasmatico, ma anche a livello nucleare, evidenziando così un ruolo protettivo della SOD1 sul DNA cellulare. Secondo questa ipotesi, la perdita di protezione del DNA dagli attacchi dei radicali liberi, contribuisce all'esordio e alla progressione della malattia.

Tutti questi risultati sono stati ottenuti sia nei MNs derivanti dai modelli animali della malattia, sia nei MNs messi in coltura.

Grazie a diverse tecniche è possibile indurre l'espressione della SOD1 mutata in sistemi sperimentali, condizione questa che mima la patologia. Ciò è dimostrato sia in colture cellulari “*in vitro*” che in topi e ratti transgenici.

Pur rappresentando tutte le imperfezioni insite in ogni modello di patologia umana, tali sistemi sperimentali sono un utile strumento per la comprensione dei meccanismi molecolari e biochimici alla base della morte dei MNs. E' proprio grazie alle sperimentazioni basate sull'utilizzo di topi [transgenici](#) che sono state avanzate differenti teorie circa il ruolo della SOD1 mutata nella SLA di tipo familiare. I topi completamente privi del gene SOD1 non sviluppano abitualmente la SLA, anche se manifestano un'accelerazione dell'atrofia muscolare e una ridotta durata di vita.

Inoltre, poiché l'aggregazione di proteine mal-ripiegate è risultata essere una caratteristica patologica comune sia alla SLA familiare che sporadica, è stato interessante osservare, nei topi transgenici per la SOD1 mutata rispetto ai controlli sani, aggregati citoplasmatici della SOD1 soltanto nei tessuti malati e maggiori quantità sono state rilevate durante la degenerazione del motoneurone. Si suppone, quindi, che l'accumulo di aggregati della SOD1 mutata svolga un ruolo nell'interruzione delle funzioni cellulari, danneggiando i [mitocondri](#), i [proteasomi](#), il ripiegamento della proteina, o altre proteine. Qualsiasi interruzione, se provata, avvalorerebbe significativamente la teoria che questi aggregati sono coinvolti nella tossicità della SOD1 mutata.

1.6.3.3 Modelli Animali e Cellulari per la SOD1^{G93A}

Fino ad oggi sono stati generati differenti modelli cellulari che esprimono stabilmente o in modo transitorio il gene SOD1 associato alla SLA. Tali modelli hanno contribuito a comprendere e chiarire meglio le cascate molecolari alla base della tossicità cellulare e della malattia (231).

Il primo modello di degenerazione motoneuronale legato alla SOD1 è stato realizzato mediante inibizione cronica dell'espressione del gene della SOD1 attraverso l'uso di oligonucleotidi antisenso o dietilditiocarbammato in colture organotipiche di midollo spinale. Lo studio di questo modello sperimentale mostra che l'inibizione cronica della SOD1 induce una degenerazione per apoptosi dei MNs spinali e la degenerazione aumenta con l'inibizione contemporanea del trasporto del glutammato (219).

Gli stessi risultati sono stati ottenuti in colture di cellule PC12 (cellule di feocromocitoma di ratto), in cui le cellule apoptotiche muoiono in seguito a down-regolazione dell'espressione della SOD1 (255).

Recentemente, è emerso che l'espressione della SOD1^{G93A} in co-culture di cellule derivanti da glioblastoma umano e neuroblastoma, induce l'attivazione della Caspasi-1, il rilascio di citochine infiammatorie e l'attivazione della cascata apoptotica. Ciò è stato anche confermato per altre mutazioni patologiche correlate alla fSLA (G37R, G85R e I113T), (96). Tuttavia, un limite degli esperimenti di transfezione stabile o transitoria, sia nelle cellule umane che murine, è rappresentato dai bassi livelli dell'espressione genica endogena, dovuta ad una bassa efficienza dei metodi convenzionali di transfezione. Si è provato a risolvere tale problema infettando differenti modelli cellulari con adenovirus ricombinanti, incapaci di replicazione e che codificano per la SOD wt o mutata, ottenendo così livelli di espressione genica simili ad entrambe le proteine SOD1 endogena ed esogena. In un sistema di colture cellulari "in vitro" è stato dimostrato che, l'infezione di cellule murine NSC-34 motoneuron-like con adenovirus codificanti per la SOD1^{G93A}, aumenta lo stress ossidativo cellulare, il danno mitocondriale, il rilascio di citocromo c e la morte dei motoneuroni (163).

I modelli animali, se comparati a quelli cellulari, permettono una migliore simulazione della malattia umana e consentono anche di seguire l'andamento della stessa (esordio, progressione e fase finale), in modo da testare e sviluppare terapie più efficaci rispetto alle attuali. Ad oggi, sono stati generati importanti ceppi di topi e ratti transgenici, attraverso l'inserimento di sequenze codificanti per la SOD1 umana sotto il controllo di un promotore capace di indurre un'espressione ubiquitaria del transgene.

Diversamente dai modelli knockouts per la SOD1, i topi e ratti transgenici con la fSLA umana, indotta da mutazioni del gene SOD1, esibiscono le caratteristiche cliniche proprie della SLA: debolezza degli arti posteriori e tremori muscolari seguiti da manifestazioni cliniche più gravi, tra cui paralisi motoria progressiva, incapacità di movimento, deglutizione e morte in poche settimane dall'esordio dei sintomi. Tra questi ceppi transgenici esistono differenze nell'età di esordio della malattia, che sembrano dipendere principalmente dal numero di copie del transgene: i topi con un elevato numero di copie manifestano un esordio precoce della malattia, mentre i topi con basso numero di copie dello stesso manifestano un esordio tardivo e una malattia a lenta progressione (150, 233). Inoltre, numerose alterazioni biochimiche, osservate nei pazienti, sono, nella maggior parte dei casi, conservate in questi modelli animali, tra cui la presenza di marcatori dello stress ossidativo e di alterazioni mitocondriali nei MNs e nei muscoli e l'attivazione delle cascate di fosforilazione (23).

Finora sono state realizzate differenti linee murine transgeniche con mutazioni in diversi siti del gene SOD1. Tuttavia, ci sono alcune differenze tra i vari ceppi e ciò dipende soprattutto dalla mutazione e dal numero di copie del transgene (261). Per esempio, la progressione della malattia è molto più rapida in topi transgenici per la G86R (3 giorni) o per la G85R (7-14 giorni) rispetto ai topi transgenici per la SOD1^{G93A} umana (60-110 giorni) (233). I topi transgenici che contengono 20 copie della SOD1 con la mutazione G93A sono quelli più ampiamente studiati (ceppo C57BL SOD1^{G93A}) (Fig. 10). In essi, la progressione dei sintomi è preceduta e parallela ad una sequenza di alterazioni strutturali e funzionali dei MNs.

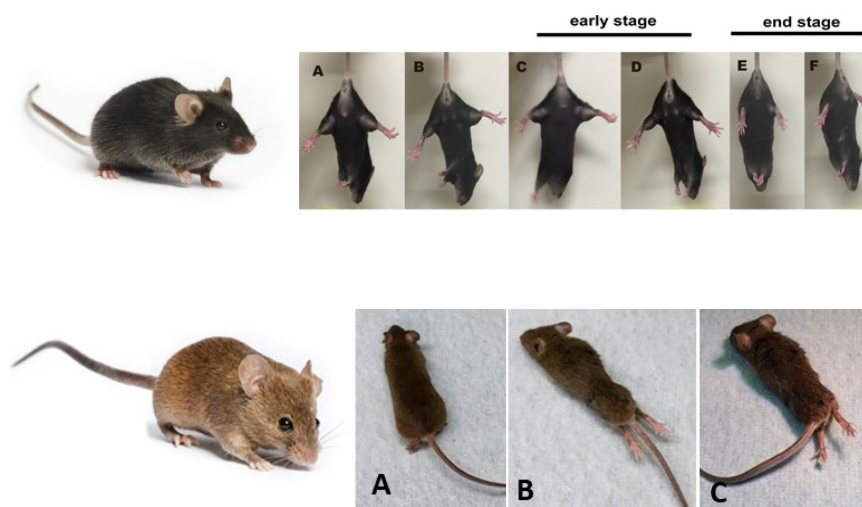


Fig. 10 Topi transgenici C57BL/SOD1^{G93A} (in alto) e 129Sv/SOD1^{G93A} (in basso), modello animale di SLA ampiamente studiato. Le immagini in sequenza (A-F alto e A-C basso) mostrano la condizione degli arti inferiori dei topi dallo stadio precoce a quello tardivo della malattia, caratterizzato da evidente atrofia muscolare e paralisi (fonte: Han J. 2016, Jara JH 2017)

Come già accennato, il grande vantaggio dei modelli animali, che mimano la patologia umana, è la possibilità di seguire la progressione graduale della malattia stessa e consentire così la sperimentazione di potenziali strategie terapeutiche. Tuttavia, nei pazienti eterozigoti i livelli di espressione della SOD1 mutata necessari per esercitare i propri effetti tossici è molto più bassa rispetto a quanto avviene nei modelli murini. Infatti, in questi modelli è necessario un incremento di circa 10-30 volte della proteina mutata per manifestare lo stesso fenotipo patologico dei pazienti. Tutto ciò è dovuto alle differenze tra uomo e topo, che, pertanto, non dovrebbero essere sottovalutate nelle sperimentazioni basate sull'utilizzo di modelli murini transgenici (25).

1.6.4 Proteina B di Membrana Associata alle Vescicole (VAPB)

1.6.4.1 Struttura e Funzioni

La proteina VAPB (proteina B associata alle proteine di membrana delle vescicole) è una proteina adattatrice ancorata al Reticolo Endoplasmatico (RE), che appartiene alla famiglia delle proteine VAPs (Proteine associate alle vescicole). Sono proteine altamente conservate nei vari organismi, dai lieviti all'uomo ed implicate in un'ampia varietà di processi cellulari, quali il traffico di membrana, il trasporto di organelli nei microtubuli e la risposta alle proteine mal ripiegate (18, 26, 263), (Fig. 11).

In particolare, nell'uomo esistono due forme di VAPs, denominate VAPA e VAPB, che sono proteine integrali di membrana di tipo II espresse ubiquitariamente nei tessuti e localizzate principalmente nel RE e nel pre-Golgi. Sono espresse nelle varie popolazioni cellulari del SNC, sono molto frequenti nei MNs e a volte co-localizzano nello stesso sito del RE. Nel muscolo scheletrico, VAPA è abbondante all'interno delle bande A e H e nella linea Z, mentre VAPB è presente nelle bande I e nella regione T (49, 51).

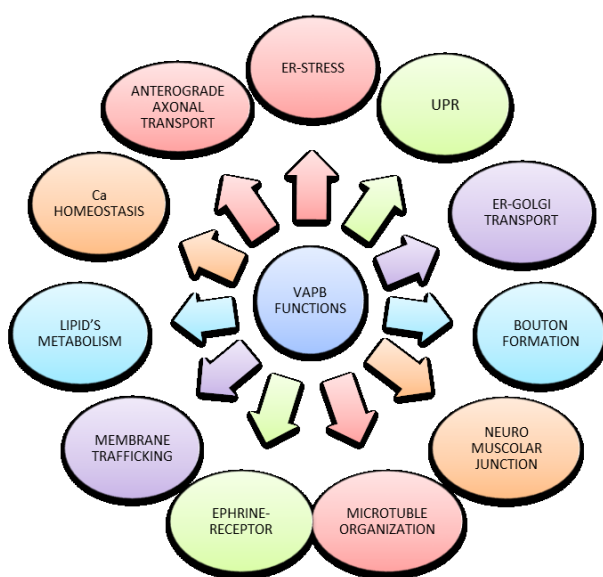


Fig. 11 Rappresentazione dei meccanismi cellulari in cui la VAPB è coinvolta in condizioni fisiologiche

La proteina VAPB contiene tre domini strutturali: un *dominio N-terminale* di 120 residui amminoacidici, altamente omologo con la proteina MSP (major sperm protein) del nematode; un *dominio centrale*, anfipatico che forma un motivo strutturale di 2-7 alfa-eliche (coiled-coil structure) e, infine, un *dominio C-terminale* di 20 residui amminoacidici idrofobici, che funziona come ancora di membrana intracellulare. VAPB da sola si trova in forma omodimerica, mentre insieme a VAPA forma un eterodimero e può interagire con VAMP1 e VAMP2.

Come già accennato precedentemente, VAPB è una proteina integrale di membrana del RE, ma si trova anche associata ad altre membrane cellulari, quali il Golgi, il compartimento intermedio RE-Golgi, gli endosomi di riciclo e la membrana plasmatica. Tutti questi siti di localizzazione della VAPB potrebbero rappresentare differenti siti di contatto tra le membrane (MCSs), detti anche punti di giunzione del RE. Gli MCSs sono siti di sovrapposizione tra le membrane del RE e quelle di altri organelli cellulari e hanno la funzione di facilitare il trasporto non-vescicolare di piccole molecole, tra cui gli ioni Calcio e i lipidi (271).

Attraverso il dominio MSP, la VAPB lega proteine che, a loro volta, legano i lipidi mediante il motivo FFAT, contenente due fenilalanine in un tratto acido, facilitando così il trasporto dei lipidi dal RE (dove vengono sintetizzati) ad altre membrane cellulari o organelli, come il Golgi e gli endosomi. Pertanto, si pensa che le VAPs regolino l'omeostasi dei lipidi cellulari mediante l'interazione diretta con proteine che legano e trasferiscono i lipidi attraverso il loro motivo FFAT (145-263). Inoltre, VAPB svolge un ruolo centrale nel metabolismo dell'inositolo, nel mantenimento della struttura del RE, nel trasporto di proteine e nell'attivazione del segnale IRE1/XBP1 nel sistema di risposta cellulare a proteine mal ripiegate, una reazione fisiologica contro l'accumulo di proteine non ripiegate o che hanno acquisito un'errata conformazione nel RE (26).

È stato osservato anche che il dominio MSP di VAPB interagisce con il fattore trascrizionale ATF6 localizzato nel RE (263), responsabile dell'attivazione di geni target per l'UPR (Sistema cellulare di Risposta alle Proteine Non ripiegate) durante lo stress dello stesso RE. L'iper-espressione o le alterazioni della VAPB attenuano l'attività del promotore regolato da ATF6/XBP1, tuttavia l'interazione VAPB-ATF6 rappresenta un meccanismo non ancora definito di omeostasi del RE e di regolazione della risposta cellulare allo stress (18).

Modificazioni nella risposta allo stress del RE e nel sistema dell'omeostasi potrebbero contribuire alla degenerazione dei MNs associata a mutazioni di VAPB (47, 263). Un altro componente del UPR e della risposta allo stress del RE è l'enzima IRE (Enzima 1 che richiede inositolo), la cui attivazione in condizioni fisiologiche è regolata dalla VAPB (49).

In aggiunta a tutte queste funzioni, la VAPB svolge anche un ruolo importante nell'omeostasi degli ioni Calcio (Ca^{2+}) e nel trasporto assonale. Sia l'RE che i mitocondri sono importanti riserve di Ca^{2+} intracellulare e sono coinvolti nello scambio del Ca^{2+} tra i vari organelli cellulari. Per facilitare tali scambi, circa il 20% della superficie mitocondriale è strettamente accostata alle membrane del RE. Queste porzioni di RE sono definite MAM (Membrane Associate ai Mitocondri) e la proteina VAPB è presente al loro interno, dove interagisce con la proteina PTPIP51 (protein tyrosine phosphatase-interacting protein-51) della membrana esterna mitocondriale. L'interazione VAPB-PTPIP51 media la regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare: infatti, il silenziamento di VAPB o PTPIP51 genera una riduzione di concentrazione degli ioni Ca^{2+} e il conseguente rilascio degli stessi dalle riserve del RE (47).

Concludendo, considerati i differenti meccanismi molecolari cellulari in cui VAPB è coinvolta, è facile comprendere come le alterazioni di uno di questi pathway possano provocare gravi conseguenze all'omeostasi neuronale. A tal proposito, recenti studi hanno identificato un'alterazione genetica della VAPB, che porta al mal-ripiegamento della proteina e successiva formazione di aggregati citoplasmatici all'interno dei MNs, che caratterizzano una forma di SLA denominata SLA 8.

1.6.4.2 Mutazioni della VAPB nella SLA 8

Una specifica mutazione missenso (P56S) nel gene umano per la VAPB è stata identificata in soggetti di otto famiglie brasiliane e recentemente in una famiglia tedesca (174, 254). Tale mutazione è ereditata in forma dominante ed è stata associata a malattie del motoneurone. Negli ultimi anni, la mutazione VAPB^{P56S} è stata identificata anche in una famiglia cinese affetta da SLA 8 da tre generazioni (223). Gli individui caratterizzati dalla mutazione P56S per la VAPB possono rientrare in tre condizioni patologiche: l'atrofia muscolare spinale (SMA), la SLA 8, entrambe con esordio tardivo e lenta progressione della malattia e una forma severa di SLA a rapida progressione (174).

La mutazione P56S consiste nella sostituzione di una C con una T nell'esone 2 del gene VAPB, che causa la sostituzione di un residuo di prolina con una serina nel dominio MSP della proteina (263). La sostituzione dei residui amminoacidici impedisce alla VAPB di assumere la giusta conformazione spaziale e la proteina mal-ripiegata che ne deriva, nota come VAPB^{P56S}, tende a formare aggregati insolubili nel citoplasma cellulare (Fig. 12). Ciò comporta anche l'acquisizione di proprietà biochimiche e biologiche alterate rispetto alla forma wild-type (wt).

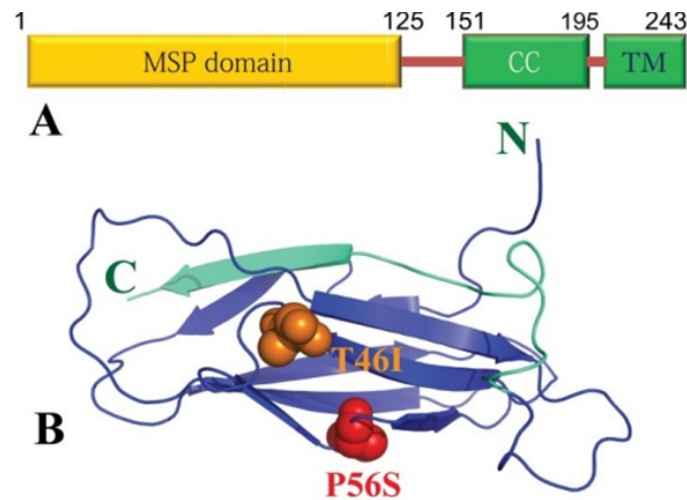


Fig. 12 Struttura della VAPB: (A) Proteina composta da 243 AA, di cui 125 costituiscono il dominio MSP, seguito dai domini CC e TM. (B) Struttura del dominio MSP: due AA (Pro56 e Thr46) sono mostrati nelle sfere, le cui mutazioni a Ser e Ile rispettivamente sono state identificate in casi SLA (fonte: Song, J 2013)

Poiché la VAPB mutata presenta un'elevata affinità per la forma wt, è facile osservare negli aggregati citoplasmatici anche la VAPB^{WT}, co-espressa nei MNs in degenerazione nei pazienti affetti da SLA (49, 221). Inoltre, tali aggregati hanno piccole dimensioni, espresse in micrometri, contrariamente agli aggregati presenti in altre patologie da accumulo di proteine che, invece, sono misurati solo se presenti ad elevate concentrazioni.

Gli aggregati di VAPB^{P56S} sono costituiti da tubuli nettamente distinti dal RE ma in continuità con esso, a dimostrazione del fatto che derivano da questo organello cellulare e, per l'elevata quantità di VAPB mutata, sono caratterizzati da un aspetto elettronico al microscopio elettronico (131).

Tutto quanto detto finora conferma che, poiché la VAPB è una proteina integrale del RE, i suoi aggregati danneggiano principalmente il RE, in quanto inseriti all'interno delle sue membrane dove formano clusters.

Questi, a loro volta, tendono a formare strutture molto più grandi e, così facendo, si ha una ri-organizzazione del RE (221) e la conseguente attivazione dei sistemi di difesa allo stress del RE, tra i quali l'UPR.

Tale sistema potrebbe essere attivato attraverso tre vie basate su XBP1, ATF6 o PPERK. In condizioni fisiologiche, VAPB è coinvolta nel processo di attivazione di XBP1 ma, quando mutata, perde l'abilità di attivare l'UPR e, intrappolando la VAPB wt negli aggregati insolubili citoplasmatici, riduce ulteriormente l'attivazione dell'UPR. Si pensa che ciò sia dovuto all'impossibilità della VAPB mutata di interagire con XBP1 a causa delle modificazioni nel dominio MSP: ciò potrebbe essere alla base dei meccanismi patogenetici della SLA 8 (49).

Inoltre, la mutazione nel dominio MSP, riduce anche la capacità di VAPB di interagire con ATF6, un altro componente del sistema UPR. Tuttavia, l'azione inibitoria di VAPB^{P56S} su ATF6 potrebbe non essere dovuta semplicemente ad una riduzione di ATF6 disponibile. Infatti, in risposta all'accumulo di proteine mal-ripiegate, ATF6 trasloca dal RE al Golgi, dove è processato da un complesso proteico ed acquisisce l'abilità di interagire con il DNA (221). ATF6 riconosce gli aggregati di proteine mal-ripiegate mediante l'interazione con il suo dominio -COOH luminale. VAPB, però, non possiede una localizzazione luminale nel RE, perciò è più probabile che agisca indirettamente su ATF6 (255). Probabilmente, poiché VAPB regola il traffico delle membrane, potrebbe inibire la traslocazione di ATF6 dal RE al Golgi, oppure agire su di esso dopo la sua traslocazione nel Golgi.

Gli aggregati VAPB^{P56S}, oltre ad alterare l'omeostasi del RE, attivando la risposta allo stress del RE, inducono alterazioni anche sul proteasoma, sulla frammentazione del

Golgi e sul sequestro di chaperonine e componenti o modulatori dell'UPS, portando così ad un'alterazione complessiva dell'omeostasi proteica cellulare e all'attivazione di meccanismi che portano alla morte motoneuronale, mediante apoptosi (197).

Altra conseguenza delle mutazioni nel dominio MSP della VAPB è l'alterazione del trasporto di lipidi attraverso le membrane cellulari, dovuto all'incapacità di VAPB^{P56S} di interagire con i motivi FFAT. Le iperlipidemie rappresentano, infatti, un tipico segno clinico della SLA familiare (231).

La VAPB mal-ripiegata ha forti ripercussioni anche sull'omeostasi del Ca²⁺, ione fondamentale per le cellule neuronali, poiché è alla base dei meccanismi eccitatori neuronali.

In generale, le alterazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} sono comuni alle malattie neurodegenerative. L'RE e i mitocondri sono importanti siti di stoccaggio del Ca^{2+} e lo scambio di tale ione avviene nelle zone di contatto tra questi due organelli, le cosiddette MAM. VAPB regola la concentrazione di Ca^{2+} mediante l'interazione con la proteina PTPIP51 della membrana esterna dei mitocondri. Tuttavia, nella forma mutata, la VAPB perde tale capacità, alterando così l'assorbimento del calcio nei mitocondri, dopo il suo rilascio dal RE (16). Inoltre, la VAPB^{P56S} altera il trasporto assonale anterogrado dei mitocondri, basato sulla chinesina-1. In presenza di elevati livelli di calcio, dovuti alla presenza di VAPB^{P56S}, la chinesina-1 si lega alla proteina Miro 1, sensore dei livelli di calcio, presente nella membrana esterna dei mitocondri. Il legame chinesina-1/Miro 1 blocca il trasporto assonale anterogrado dei mitocondri (261).

Importanti studi su topi transgenici hanno evidenziato la presenza di un'altra proteina negli aggregati della VAPB mutata: la proteina FUS (Fused in Sarcoma), codificata da un altro importante gene causativo della SLA. È una proteina nucleare che si lega a DNA e RNA e regola l'espressione genica a differenti stadi, ovvero trascrizione, splicing, trasporto del mRNA e legame con gli mRNA di VAPB e TDP-43 (77).

La TDP-43 è una proteina nucleare espressa ubiquitariamente ed è coinvolta nella trascrizione genica, nello splicing, nella stabilità del mRNA, nella sintesi degli miRNA e nella formazione di corpi nucleari. Mutazioni a carico del gene di questa proteina sono state identificate come aggregati citoplasmatici ubiquitinati della proteina TDP-43 sia in casi fSLA che in sSLA. Pertanto, la presenza di tali aggregati nei motoneuroni è considerato uno dei marcatori patologici della SLA e il gene per la TDP-43 è stato classificato come altro gene causativo di SLA che, in questo caso, è definita SLA 10.

In questi casi di SLA, gli aggregati di TDP-43 appaiono come uno schema di inclusioni tonde e allungate. Tali inclusioni differiscono da quelle trovate nei casi di SLA 8 che, invece, risultano meno definite e distribuite in modo più uniforme. Queste differenze sono state identificate in studi su topi transgenici, dai quali è emerso che gli aggregati di TDP-43 differiscono nei due tipi di modelli sperimentali di SLA e, allo stesso tempo, hanno permesso di identificare una correlazione tra la presenza di VAPB^{P56S} e un alterato metabolismo della TDP-43.

Un'altra possibile causa della formazione di aggregati di TDP-43 potrebbe essere spiegata dall'alterazione del traffico di membrane dovuto alla VAPB^{P56S} che blocca il trasporto di TDP-43 dal RE, dove è sintetizzata, al nucleo, dove è richiesta per espletare le sue funzioni (258).

Studi in animali transgenici per la VAPB^{P56S} mostrano che la proteina mutata si accumula principalmente nel soma e nei dendriti di neuroni cortico-spinali (CSMNs) e nei motoneuroni spinali (SMNs), in cui infatti sono stati osservati significativi aumenti di marcatori dello stress del RE e dell'UPR e la up-regolazione di proteine pro-apoptotiche. Nonostante ciò, è evidente solo la perdita dei CSMNs e non dei SMNs, nei quali è presente una selettiva traslocazione della VAPB^{P56S} nel cosiddetto bottone C post sinaptico, alterandone la conformazione e compromettendo le spontanee scariche ritmiche dei SMNs.

Solo la VAPB^{P56S}, e non la VAPB wt, è presente nel bottone C, pertanto si pensa che, essendo alterata, acquisti la capacità di legare altre strutture molecolari importanti per l'orientamento del bottone C post sinaptico (216).

1.6.4.3 Modelli Animali e Cellulari per la VAPB^{P56S}

Per comprendere se la perdita di funzione della proteina VAPB possa indurre la degenerazione dei motoneuroni, sono stati creati differenti modelli sperimentali, quali zebrafish e modelli murini, entrambi con una espressione ridotta o assente della VAPB (139).

I topi knocked out per VAPB (Vapb -/-) mostrano un debole e tardivo esordio dei deficit motori, non presentano difetti morfologici della giunzione neuromuscolare né alterazioni dell'innervazione muscolare. Invece, i modelli knockdown di zebrafish presentano difficoltà natatorie.

Sono stati creati anche topi transgenici che iper-esprimono la VAPB mutata in modo specifico nel Sistema Nervoso e, nonostante presentino aggregati di VAPB, non manifestano un evidente fenotipo SLA.

In sostanza, mutazioni della VAPB che ne determinano un aumento o una riduzione dell'espressione non sono sufficienti a determinare il fenotipo SLA, anche se causano sintomatologia clinica di tipo neurologico e muscolare. Pertanto, tali mutazioni sono da considerarsi un fattore di rischio nella patogenesi della SLA.

Ad oggi sono stati creati topi transgenici VAPB^{P56S}, caratterizzati dalla presenza di un sistema tubulare paragonabile al RE liscio e da inclusioni citoplasmatiche della VAPB mutata e mal ripiegata, associate alle cisterne del RE (147, 154). Questi topi manifestano denervazione neuromuscolare e anomalie patologiche nel midollo spinale (es. perdita di motoneuroni e gliosi).

Anche i modelli cellulari di VAPB sono importanti per lo studio dell'eziopatogenesi della SLA. In particolare, sono state realizzate colture primarie neuronali derivanti dall'ippocampo di ratti e transfettate con il gene wt e mutato per la VAPB. L'espressione di VAPB mutata in queste colture, analogamente a quanto osservato nei modelli "in vivo", porta alla formazione di aggregati proteici nel citoplasma, localizzati a livello del RE e che intrappolano anche la forma wt della VAPB.

Come già detto in precedenza, tra le funzioni cellulari di VAPB è incluso un suo coinvolgimento nell'attivazione del sistema UPR e nell'omeostasi del RE. Nello specifico, in casi di SLA sono state evidenziate alterazioni dell'UPR che sembrano correlate alla perdita di funzione o della corretta conformazione di VAPB. Ciò è stato osservato sia in modelli cellulari che animali per la VAPB^{P56S}.

1.7 Patogenesi

Sebbene la SLA sia ancora oggi considerata una patologia rara, è la più frequente malattia del motoneurone, i cui meccanismi patogenetici rimangono ancora poco chiari, poiché le potenziali cause che concorrono alla perdita dei neuroni sono multiple e ancora sconosciute (279).

Le ipotesi avanzate sulla neurodegenerazione, che caratterizza entrambe le forme sporadiche e familiari, evidenziano un modello piuttosto complesso a cui contribuiscono attivamente non solo le mutazioni genetiche e i fattori ambientali ma anche differenti fattori cellulari che comprendono lo stress ossidativo, il misfolding proteico e l'aggregazione proteica, l'eccitotossicità, le disfunzioni mitocondriali, l'apoptosi, le alterazioni del sistema ubiquitina-proteasoma e dei pathways di autofagia, i difetti del metabolismo del RNA e le anomalie nel trasporto assonale (29, 220), (**Fig. 13**). Recentemente, inoltre, è emerso il ruolo chiave delle cellule non neuronali, quali astrociti e microglia, nella patogenesi del danno ai MNs soprattutto in quanto coinvolte in differenti pathways molecolari di segnale e nella neuroinfiammazione (96).

Tutti questi fattori genetici, ambientali e cellulari contribuiscono contemporaneamente al processo di morte dei MNs che avviene attraverso il meccanismo di morte cellulare programmata dipendente da caspasi, noto anche come apoptosi (231).

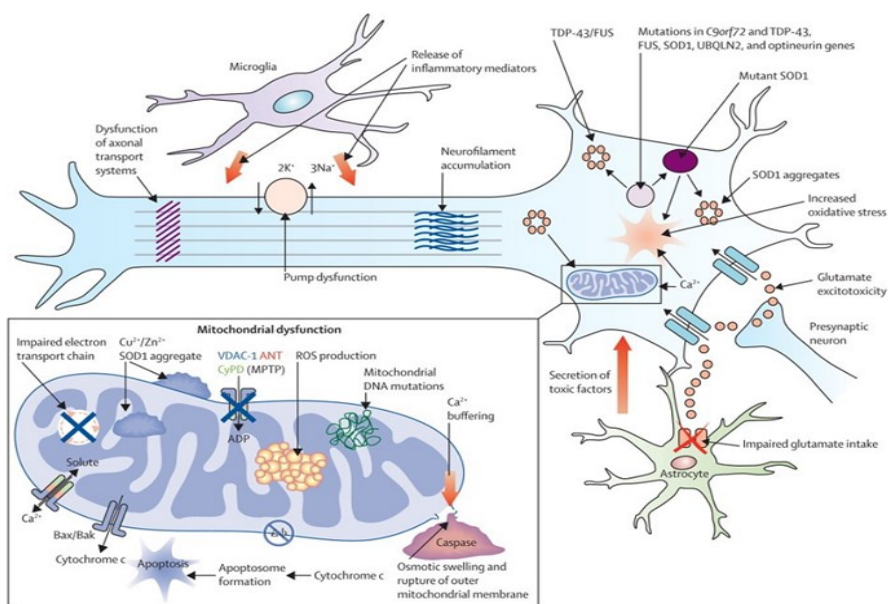


Fig. 13 Meccanismi patogenetici alla base della neurodegenerazione nella SLA (fonte: Turner R. 2013)

Poiché tali fattori sono coinvolti in maniera complessa e differente a seconda del paziente, il compito fondamentale di medici e ricercatori è quello di comprendere sempre più i meccanismi alla base delle varie categorie delle malattie motorie-neuronali.

Qui di seguito sono riportate le caratteristiche dei fattori cellulari che causano la morte dei MNs, che saranno meglio approfondite nei relativi paragrafi:

Stress ossidativo: il danno cellulare dovuto ai radicali dell'ossigeno e ad altre sostanze tossiche che si accumulano all'interno della cellula, potrebbe portare alla morte cellulare, con un processo simile all'invecchiamento fisiologico;

Alterazioni mitocondriali: il mitocondrio, organello responsabile della produzione energetica all'interno della cellula, potrebbe essere coinvolto nei meccanismi di morte del motoneurone;

Accumulo di proteine anomale all'interno della cellula: l'accumulo di proteine alterate all'interno del motoneurone contribuisce alla morte cellulare. Nella maggior parte dei pazienti, sono state identificate proteine anomale e mal-ripiegate che tendono a

formare aggregati citoplasmatici tossici per le cellule. Ad esempio, in alcuni pazienti, sia in forme sporadiche che in alcune forme familiari, è stata identificata la proteina TDP43; nei pazienti portatori di mutazione del gene SOD1 o del gene FUS, le proteine anomale sono la SOD1 e la FUS, entrambe alterate e tossiche per le cellule;

Eccesso di glutammato: è una delle prime ipotesi avanzate per giustificare la degenerazione dei motoneuroni. Il glutammato è un aminoacido utilizzato dalle cellule nervose come segnale chimico: quando il suo tasso è elevato ne determina un'iperattività che può risultare nociva. Tutto ciò sembra avere un ruolo importante nella SLA. Ciò spiega anche il fatto che il Riluzolo, unico farmaco finora approvato nella terapia della SLA, agisce proprio riducendo l'azione del glutammato;

Alterazione dei meccanismi di trasporto intraneuronale: alcune mutazioni genetiche rare codificano per proteine implicate nel trasporto assonale, ossia il trasporto di sostanze dal nucleo alla periferia della cellula;

Deficit dei meccanismi di eliminazione di proteine intracellulari: attraverso alcuni specifici meccanismi di difesa della cellula (autofagia, lisosomi, ecc.), i motoneuroni eliminano i prodotti anomali e tossici. Sembra che nella SLA questi meccanismi siano alterati e contribuiscano al danno neuronale;

Neuroinfiammazione: oltre al motoneurone esiste anche una sofferenza delle cellule gliali, che si trovano in uno stato infiammatorio nocivo per le cellule. È ancora dibattuto se questo stato infiammatorio sia una concausa oppure una conseguenza del danno motoneuronale;

Carenza di fattori di crescita: si tratta di sostanze, prodotte naturalmente dal nostro organismo, che aiutano la crescita dei nervi e che facilitano i contatti tra i motoneuroni e le cellule muscolari.

1.7.1 Stress Ossidativo

Elemento centrale del danno cellulare nelle patologie neurodegenerative, compresa la SLA sporadica e familiare, è lo stress ossidativo legato ad un'eccessiva produzione di ROS. Tuttavia il suo ruolo nella progressione della patologia rimane ancora sconosciuto (20).

Nello specifico, studi clinici e preclinici hanno evidenziato che le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da elevati livelli di biomarcatori dello stress ossidativo e, contemporaneamente, da un ridotto funzionamento delle difese anti-ossidanti, sia nel cervello che nei tessuti periferici.

In condizioni fisiologiche, i ROS, prodotti nella catena respiratoria cellulare, sono facilmente neutralizzati dai sistemi anti-ossidanti della cellula, presenti nei mitocondri, quali SOD1, SOD2 e glutazione perossidasi (143).

In condizioni particolari, come nei casi fSLA caratterizzati da mutazioni della SOD1, si osserva un'eccessiva produzione di ROS e di RNS, che eccede la massima capacità delle difese anti-ossidanti, e quindi un'alterazione dell'equilibrio pro/anti-ossidante cellulare che conduce allo stress ossidativo. L'eccesso di ROS e RNS causa danni irreversibili ai componenti cellulari, tra cui le proteine, il DNA, i lipidi, le membrane cellulari e i mitocondri ed attiva le vie pro-apoptotiche (28).

Secondo alcune ipotesi, la SOD1 mutata potrebbe perdere la propria capacità antiossidante (220), diventando accettore di perossinitrito e perossido di idrogeno e successivamente catalizzare la nitratura di suoi residui di tirosina e idrossiradicali (21, 272). A dimostrazione di ciò, elevati livelli di nitrotirosina e proteine nitate sono state trovate nel fluido cerebrospinale di pazienti sSLA e fSLA (253). Secondo altre ipotesi, la SOD1 mutata non riuscirebbe a legare correttamente lo Zinco, inducendo una rapida riduzione dello stesso che, quindi, catalizzerebbe la formazione dell'anione superossido piuttosto che la sua dismutazione (94).

Altri studi sperimentali hanno evidenziato che l'attività della SOD1 mutata risulta essere particolarmente deleteria per i motoneuroni, rispetto ad altri tipi cellulari, come se questi avessero una maggiore suscettibilità al danno ossidativo (145). In particolare, studi ultrastrutturali in modelli murini esprimenti SOD1 mutata, hanno evidenziato nei motoneuroni, soprattutto a livello dei dendriti e negli assoni, la presenza di alterazioni della morfologia mitocondriale, come la formazione di numerose vacuolizzazioni (263).

La SOD1 mutata, che tende ad accumularsi in aggregati all'interno dello spazio intermembrana, promuove la protrusione della membrana esterna e la vacuolizzazione mitocondriale ed è, quindi, in grado di danneggiare il mitocondrio.

Le modificazioni ultrastrutturali dei mitocondri possono essere coinvolte nella patogenesi della SLA, in quanto producono alcune disfunzioni mitocondriali, alterando l'attività di specifici enzimi in esso presenti. Lo spazio intermembrana, ad esempio, contiene specifici enzimi in grado di utilizzare l'ATP prodotto nella membrana interna, come il citocromo c, importante fattore promotore dell'apoptosi. Ulteriori deficit sono stati altresì evidenziati a livello del Complesso I (47) e del Complesso IV (254) della catena respiratoria nei mitocondri dei muscoli e dei motoneuroni del midollo spinale di pazienti affetti da SLA (174).

1.7.2 Alterazioni mitocondriali

Numerosi studi hanno evidenziato alterazioni mitocondriali nel midollo spinale di pazienti sSLA, e ciò ha indotto a focalizzare l'attenzione sul ruolo dei mitocondri nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, quali la SLA (274). La presenza di mitocondri anomali e degenerati è evidente sia nei pazienti affetti da SLA (225) che in modelli cellulari e animali di SLA (8, 172), sebbene sia ancora sconosciuta la relazione tra mitocondri non funzionanti ed esordio della patologia.

In particolare, l'espressione della SOD1 mutata nella linea cellulare motoneuronale NSC-34 sembra portare allo sviluppo di mitocondri rigonfi, malfunzionamento dei complessi II e IV della catena respiratoria mitocondriale ed alterazioni nello stato bioenergetico cellulare e nel proteoma mitocondriale (246). In modo simile, i topi SOD1^{G93A} mostrano una ridotta attività della catena respiratoria e una riduzione nella sintesi di ATP (134).

Recenti studi hanno evidenziato che anche l'iper-espressione della TDP-43 causa disfunzioni mitocondriali ed induce mitofagia in colture cellulari esprimenti la proteina mutata (126), così come un'eccessiva produzione di ROS e danni alla catena respiratoria mitocondriale (85).

1.7.3 Accumulo di Proteine Anomale

Aggregati proteici sono spesso ritrovati nei motoneuroni spinali di pazienti affetti da SLA. Queste inclusioni contengono differenti proteine, alcune delle quali potrebbero avere una tendenza intrinseca ad aggregare in seguito a mutazioni genetiche (SOD1, TDP-43, VAPB, FUS), mentre altre potrebbero essere semplicemente intrappolate negli aggregati (SOD1 wt e VAPB wt) (60). In particolare, aggregati cisteina-mediati della SOD1 mutata sono stati evidenziati nei motoneuroni SLA e al loro interno risulta presente anche la forma wild type della SOD1, mostrando quindi una forte affinità e co-aggregazione delle due forme della proteina (116).

È opinione diffusa che la funzione tossica della SOD1 mutata e di altre proteine tipiche della SLA sia correlata alla loro tendenza ad aggregare. Questa ipotesi è supportata dalla presenza di inclusioni citoplasmatiche intracellulari, ma anche mitocondriali, ricche di SOD1 in modelli cellulari e nei motoneuroni spinali animali, così come anche nei motoneuroni di pazienti SLA (46, 60).

Nel corso degli anni, numerose teorie sperimentali sono state proposte allo scopo di spiegare come l'aggregazione di proteine mutanti potesse contribuire alla tossicità cellulare in pazienti affetti da SLA.

Tra queste emergono la capacità di sequestrare proteine necessarie per il normale funzionamento del motoneurone (198), la capacità di ridurre l'attività del proteasoma, indispensabile per il corretto turnover proteico, e l'abilità nell'inibire il corretto funzionamento di specifici organelli cellulari, quali mitocondri, mediante aggregazione all'esterno o all'interno degli stessi (3, 246).

Il fatto che l'aggregazione proteica sia caratteristica comune nella SLA e che la degenerazione cellulare dipenda dalla sensibilità dei MNs all'aggregazione di proteine nella forma mutata è suggerito anche dall'osservazione che, come la SOD1, anche TDP-43 e FUS aggregano nei tessuti di pazienti e nei modelli di SLA (166).

Osservazioni anatomico-patologiche di tessuti derivanti da pazienti SLA mostrano, infatti, che queste due proteine aggregano come inclusioni citoplasmatiche (positive per l'ubiquitina, ma negative per la SOD1) e che le mutazioni che le riguardano sembrano aumentare il loro grado di aggregazione (137, 242). Recentemente, inoltre, è stato dimostrato che l'aggregazione di FUS e TDP-43 si basa su domini "prion-like" e che tali aggregati possono sequestrare anche le proteine wt e nella forma nativa (27).

La formazione degli aggregati intracellulari potrebbe dipendere dall'accumulo di proteine mal-ripiegate e generate o come diretta conseguenza della mutazione, o come conseguenza dello stress ossidativo. In entrambi i casi, il malfunzionamento del sistema di risposta alle proteine mal-ripiegate (UPR) sembra avere un ruolo chiave.

Non solo le inclusioni ubiquitina-immunoreattive sono le più frequentemente riportate in tutte le forme di SLA, ma gli aggregati potrebbero essere reattivi a p62, una proteina che prende parte alla formazione del sequestosoma e all'autofagia (104).

1.7.4 Eccitotossicità da Glutammato

Altro componente della degenerazione neuronale in molte patologie neurodegenerative è rappresentato dall'eccessiva stimolazione, indotta dal glutammato, dei recettori post-sinaptici per il glutammato, che causa un eccessivo ingresso (intake) di calcio e conseguente danno neuronale (230).

L'uptake di glutammato in molte sinapsi del SNC è controllato dal trasportatore dell'aminoacido eccitatorio 2 (EAAC2, anche noto come SLC1A2 o GLT1), (262). Nei pazienti SLA sono stati riscontrati elevati livelli di glutammato intracellulare e un ridotto uptake dello stesso amminoacido nelle sinapsi (218). Infatti, in molti casi di sSLA e in modelli murini transgenici è evidente una profonda riduzione di espressione e di attività del recettore EAAT2 nella corteccia cerebrale e nel midollo spinale (130).

L'eccitotossicità da glutammato ha fornito uno dei pochi esempi di correlazione tra SOD1 mutata e forma sporadica della SLA. La presenza, infatti, di tale proteina mutata aumenta la sensibilità dei MNs alla tossicità del glutammato (153), causa alterazioni nell'espressione delle subunità del recettore AMPA (240) e, infine, causa una ridotta espressione del principale trasportatore di re-uptake del glutammato, EAAT2 (26).

Concludendo, sembra che la tossicità da glutammato, come processo primario o propagatorio della malattia, contribuisca fortemente al danno dei motoneuroni nella SLA.

1.7.5 Alterazioni nel Trasporto Assonale

Il trasporto assonale è un meccanismo chiave richiesto per la vitalità delle cellule neuronali. Il trasporto di molecole e organelli è un processo cellulare fondamentale che risulta particolarmente importante per lo sviluppo, il funzionamento e la sopravvivenza dei neuroni.

Importanti risultati indicano che anomalie nel trasporto assonale potrebbero contribuire alla degenerazione dei MNs nella SLA (57).

Innanzitutto, l'accumulo di neurofilamenti (NF) nei MNs è un altro marcatore istopatologico della SLA (98) e topi transgenici che sovra-esprimono subunità dei NF nei MNs sviluppano patologie del motoneurone con danni nel flusso assonale, poiché le alterazioni assionali causano ritardi nel trasporto dei componenti richiesti per il mantenimento dell'assone (57).

In secondo luogo, entrambi i trasporti assonali anterogrado lento e veloce risultano essere rallentati nei topi transgenici $SOD1^{G93A}$ e $SOD1^{G37R}$ ancor prima dell'esordio della malattia e questi deficit sono aggravati ulteriormente durante la progressione della patologia (31). Infine, il trasporto retrogrado sembra essere distrutto in topi transgenici, modelli di SLA (179).

Un recente studio dimostra che la $SOD1^{wt}$ ossidata, immunopurificata dai tessuti di pazienti sSLA, inibisce il trasporto assonale basato sulle chinesine in modo simile alla $SOD1$ nelle forme fSLA. Ciò rappresenta, tra l'altro, un'ulteriore evidenza di meccanismi patogenetici comuni alle due forme di SLA, sporadica e familiare (33).

Gli aggregati di NF, inoltre, sono associati con le attività della $SOD1$ e della Ossido Nitrico Sintasi, portando alla formazione di nitro-tirosine negli stessi NF (53). Le nitro-tirosine, a loro volta, possono inibire la fosforilazione delle subunità dei NF e potrebbero così alterare il trasporto assonale, avviando il processo di morte motoneuronale.

Tutti questi risultati, nel loro insieme, suggeriscono una relazione tra la regolazione redox cellulare e le alterazioni nel trasporto assonale nella SLA.

1.7.6 Neuroinfiammazione e ruolo delle cellule non-neuronali

Recentemente è emerso un notevole interesse sulla possibilità che cellule non-neuronali, quali microglia attivata ed astrociti, possano influire attivamente sulla patogenesi o progressione della SLA. Infatti, studi su modelli animali di SLA indicano che la sola espressione della SOD1 mutata nei neuroni è insufficiente a causare la degenerazione degli stessi e che è richiesta la partecipazione di cellule non-neuronali (96).

Gli astrociti svolgono numerose funzioni fondamentali per la fisiologia dei MNs. Innanzitutto, esprimono il principale trasportatore del glutammato EAAT2/GLT-1, contribuendo così alla clearance di questo neurotrasmettitore: un deficit di EAAT2/GLT-1 negli astrociti è causa della perdita severa di MNs (99) ed alterazioni a carico di questo trasportatore sono state ripetutamente considerate tra le cause di insorgenza della SLA (220). In secondo luogo, gli astrociti sono la maggiore fonte di fattori trofici (89) e tossici per i MNs. Inoltre, numerose citochine sembrano avere un ruolo centrale nella SLA come “reinforcing signals” delle cellule gliali, incluse l’interleuchina 6 (IL6), il tumor necrosis factor α (TNF α) e il fattore di crescita trasformante β 1 (TGF β 1), tutte identificate nel fluido cerebrospinale, nel plasma e nell’epidermide di pazienti SLA, sebbene in letteratura siano presenti risultati discordanti in merito (195). Anche la produzione di ossido nitrico e l’attivazione della ciclo-ossigenasi 2 (COX2) peggiorano gli effetti tossici della SOD1 mutata in numerosi modelli sperimentali di SLA.

La produzione di tutti questi mediatori pro-infiammatori potrebbe essere secondaria all’induzione del fattore di trascrizione NF-kB, attivato in presenza di ROS e da molte altre molecole di segnale associate all’esordio e progressione della SLA (140). L’attivazione del NF-kB è stata osservata negli astrociti di pazienti SLA e in cellule umane esprimenti la SOD1 mutata (43). Inoltre, esso è regolato dall’espressione di COX2, che potrebbe causare un incremento nella sintesi di prostaglandine, le quali inducono, a loro volta, il rilascio di glutammato dagli astrociti e stimolano la formazione di radicali liberi, contribuendo così all’eccitotossicità e al danno ossidativo. A tal proposito, il trattamento con inibitori di COX2 protegge notevolmente i MNs e prolunga significativamente la sopravvivenza di topi transgenici affetti da SLA (207).

Sorprendentemente, una down-regolazione del NF- κ B negli astrociti, attraverso l'espressione di I κ B- α -AA, non influenza l'esordio, la severità o la progressione della malattia in modelli murini di SLA esprimenti la SOD1 mutata (64).

Recentemente, è emerso anche un ruolo cruciale della microglia, come cellule residenti, immunocompetenti e fagocitiche del SNC.

L'attivazione della microglia è associata alla trasformazione in cellule fagocitiche capaci di rilasciare molecole potenzialmente citotossiche, inclusi ROS, ossido nitrico, proteasi e citochine pro-infiammatorie, quali IL-1 β , TNF α e IL-6 (111). Considerato ciò, non c'è dubbio che la microglia attivata possa influire significativamente sul danno neuronale, ma il suo ruolo è complesso, in quanto capace sia di stimolare una neuroprotezione che indurre effetti neurotossici. La proliferazione della microglia attivata rappresenta un'importante caratteristica istologica nelle corna ventrali del midollo spinale di topi transgenici SOD1 e di pazienti SLA (1). Nei modelli murini, l'attivazione della microglia è presente prima dell'esordio di una significativa perdita o debolezza motoneuronale.

Differenti citochine infiammatorie o enzimi sono up-regolati nel midollo spinale di pazienti SLA (IL-6, IL-1 β , COX2 e prostaglandina E2 (PGE2)) e di topi transgenici per la SOD1 (IL-1 β , TNF α , COX2, PGE2), (124). Sembra che la microglia medi la tossicità dei neuroni nei pazienti affetti da SLA mediante il rilascio di fattori che aumentano la tossicità indotta dal glutammato (36). In una recente ricerca, D'Ambrosi e colleghi hanno studiato come la SOD1 mutata influenza l'attivazione pro-infiammatoria microgliale, mediata dal recettore P2, considerando che l'ATP extracellulare è uno dei più diffusi segnali di allarme della microglia endogeno al SNC e che il signaling dell'ATP stimola molte funzioni pro-infiammatorie della microglia. Essi hanno osservato una up-regolazione dei recettori P2X(4), P2X(7) e P2X(6) ed una down-regolazione delle attività di idrolisi dell'ATP nella microglia che esprime la SOD1 mutata. Questa potenzialità dei recettori purinergici P2X riflette una maggiore sensibilità soprattutto sul 2'-3'-O-(benzoyl-benzoyl) ATP, un agonista preferenziale del recettore P2X(7), e si traduce in profondi cambiamenti morfologici, un aumento del TNF- α e della ciclossigenasi-2 e, infine, in effetti tossici esercitati sui neuroni dalla microglia esprime la SOD1 mutata (66). L'attivazione purinergica della microglia potrebbe in questo modo costituire un nuovo meccanismo coinvolto nella progressione della SLA, da essere sfruttato per ricercare nuovi approcci che possano bloccare la patologia.

1.7.7 Alterazioni nel processamento del RNA

Tra gli ultimi fattori genetici identificati nella SLA, TDP-43 e FUS codificano per proteine con un ruolo nel metabolismo del RNA. Ciò implica, quindi, che un malfunzionamento del metabolismo del RNA possa essere un potenziale meccanismo fisiopatologico nella degenerazione dei motoneuroni. Poiché il metabolismo del RNA coinvolge differenti processi, quali splicing del pre-mRNA, trasporto del mRNA, regolazione traslazionale ed eliminazione del mRNA, il preciso pathway del RNA che è colpito nella SLA è ancora incerto, mentre è risaputo che i difetti nel processamento del RNA hanno un ruolo diretto e causativo nella patogenesi della SLA (61).

In condizioni di stress, la priorità di una cellula è quella di risparmiare energia e indirizzare tutte le risorse cellulari verso la sopravvivenza. Nelle cellule eucariotiche, un modo potente ed efficace di conservare risorse è assemblare rapidamente gli mRNA non tradotti e le proteine leganti l'RNA ad essi associate in strutture simili ad aggregati, chiamate "granuli RNP", che includono anche i granuli di stress (SGs), (7).

In condizioni fisiologiche, TDP-43 e FUS sono proteine nucleari che possono essere rapidamente trasportate al citoplasma in seguito a stress, dove possono associarsi con gli SGs (14, 80). Una volta che lo stress termina, gli SGs si dissolvono e TDP-43 e FUS ritornano al nucleo. Quindi, il trasporto nucleo-citoplasma di tali proteine, così come la loro associazione con gli SGs citoplasmatici, sono processi fisiologici e reversibili. Tuttavia, in condizioni patologiche, il trasferimento nucleo-citoplasma di TDP43 e FUS si altera, probabilmente a causa di differenti fattori genetici ed ambientali, o forse anche per l'invecchiamento cellulare (161).

Diversi modelli sono stati proposti per spiegare il ruolo di FUS, TDP-43 e degli SGs nella patogenesi della SLA:

i) Modello di tossicità da acquisizione di funzione (Gain Of Function - GOF): gli aggregati di TDP-43 e FUS nei granuli SGs impediscono la normale omeostasi del RNA mediata dagli SGs. In questo modello, l'eccessiva presenza di FUS e TDP-43 negli SGs (32, 164) potrebbe indurre un assemblaggio errato degli aggregati fibrillari anomali (242), alterando così la localizzazione dei messaggeri per le RNPs (mRNPs) richiesti per il processamento e la degradazione del RNA ed interferendo con i normali meccanismi del metabolismo del RNA. Se tale processo continuasse senza sosta, alla fine l'assemblaggio dei complessi di inizio della traduzione potrebbero essere

alterati, portando all'aumento della concentrazione di mRNA e dei fattori per la traduzione (41). Infine, gli aggregati insolubili di FUS e TDP-43 alterano le dinamiche degli SGs anche dopo la risoluzione dell'impulso dello stress (198), risultando così in una permanenza eccessiva degli SGs, come osservato in cellule esprimenti le forme mutate per TDP-43 e FUS, associate alla SLA.

ii) Modello di perdita di funzioni citoplasmatiche (Loss Of Function - LOS): FUS e TDP-43 sono mediatori critici del trasporto nucleo-citoplasma degli RNA e influenzano la formazione fisiologica degli SGs durante condizioni di stress cellulare. In cellule HeLa e in linee cellulari di neuroblastoma private della TDP-43 è stato osservato più volte che tale proteina ha specifici effetti sulla dinamica degli SGs, tra cui ritardare la formazione, ridurre la grandezza, alterare la morfologia e limitare la stabilità (13). Inoltre, FUS^{wt} sembra essere reclutato dall'attivazione di mGluR5 nei dendriti neuronali, dove induce un aumento del RNA locale, mentre i neuroni privi di FUS mostrano un'anomala morfologia e densità della spina dorsale (102), sottolineando che la perdita della normale funzione di FUS può contribuire alla patogenesi della SLA.

iii) Sebbene il modello LOF sia coerente con molti aspetti delle interazioni patologiche di TDP-43 e FUS, è da considerare anche che entrambe le proteine svolgono importanti ruoli all'interno del nucleo cellulare, inclusi splicing del pre-mRNA, regolazione della stabilità e trascrizione degli RNA (156). Così, l'esaurimento dei pool di TDP-43 e FUS nel nucleo potrebbe influire sulle essenziali funzioni nucleari delle stesse proteine. Inoltre, le mutazioni SLA-correlate potrebbero perfino diminuire le funzioni nucleari di TDP-43 e FUS in modo selettivamente tossico per i motoneuroni dopo l'invecchiamento, senza necessariamente richiedere un esaurimento dei pool nucleari (157, 206).

1.7.8 Apoptosi

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è una morte cellulare che rientra in un programma fisiologico volto a mantenere il benessere di un tessuto e dell'organismo. In alcuni tipi di cellule è legata all'innescò di un "orologio biologico", che elimina la cellula quando è invecchiata; in altri tipi cellulari, invece, è legata a segnali dell'ambiente circostante, come la sospensione di segnali di sopravvivenza o la trasmissione di un segnale di morte da parte di un recettore di morte.

Dal punto di vista morfologico, l'apoptosi è caratterizzata da una riduzione del volume cellulare, picnosi, frammentazione del nucleo e danni a livello della membrana. Le proteine citosoliche sono inattivate mentre il DNA viene tagliato a livello di siti internucleosomali da endonucleasi. Ciò si traduce in una frammentazione della cellula con formazione dei corpi apoptotici, che vengono fagocitati dai macrofagi, grazie a specifici recettori, capaci di riconoscere un insieme di molecole espresse dalle cellule apoptotiche.

Evento centrale dell'innescò dell'apoptosi è l'attivazione di una cascata di proteasi citoplasmatiche, dette Caspasi. Queste attivano una serie di proteine responsabili delle modificazioni cellulari che si verificano durante l'apoptosi. Contemporaneamente, inducono un danno mitocondriale che porta al rilascio di citocromo c, il quale attiva ulteriormente il sistema delle Caspasi (75).

In particolare, esistono due vie di attivazione dell'apoptosi: i) *via estrinseca* o mediata dal "recettore della morte", in cui la morte cellulare inizia con l'interazione tra uno specifico ligando proteico e un recettore transmembrana sulla superficie cellulare; ii) *via intrinseca* o via mitocondriale, in cui la morte cellulare è attivata attraverso un'alterazione mitocondriale (229).

Entrambe le vie conducono all'attivazione delle Caspasi. La Caspasi 3 è l'effettore di entrambe le vie ed è attivata dalla Caspasi 8 nella via recettoriale e dalla Caspasi 9 nella via mitocondriale.

Nella via mitocondriale, l'attivazione delle Caspasi è mediata da un complesso multiproteico ATP-dipendente, chiamato Apoptosoma, che richiede il rilascio di citocromo-c dai mitocondri. Le proteine della famiglia Bcl-2, localizzate nella membrana mitocondriale esterna, sono importanti fattori nel prevenire o consentire l'apoptosi e nel controllare il rilascio di citocromo c (177). La concentrazione dei membri di questa famiglia funziona da indicatore per la morte cellulare. Infatti, questa famiglia comprende membri anti-apoptotici (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1, and Mcl-1), che promuovono la sopravvivenza cellulare, e membri pro-apoptotici (Bax e Bak), che agiscono come effettori della morte cellulare (229). L'equilibrio tra le proteine pro e anti-apoptotiche, espresse nella membrana mitocondriale esterna, probabilmente determina se deve essere attivata la morte cellulare oppure se le cellule continueranno a vivere (10). La morte dei motoneuroni è caratteristica costante della SLA ed è ormai accertato che avviene in seguito all'attivazione dei meccanismi apoptotici (119).

Il coinvolgimento della via apoptotica mitocondriale nella SLA è confermato da un'ampia letteratura, che ha documentato una varietà di fenotipi apoptotici nei tessuti di pazienti e di topi transgenici, così come in colture cellulari che sovraesprimono la SOD1 mutata (60).

Molteplici evidenze sperimentali correlano la morte dei motoneuroni nella SLA ad alterazioni a carico della famiglia Bcl.

L'alterazione dell'espressione dei geni pro e anti apoptotici, l'attivazione delle Caspasi e il rilascio di citocromo-c sono stati riscontrati nel midollo spinale di topi transgenici che esprimono SOD1 con la mutazione G93A e in pazienti umani senza mutazioni per la SOD1 (119, 200). In essi è stata osservata una diminuzione di espressione delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL ed un aumento delle proteine pro-apoptotiche Bax e Bak (168, 266). Bax, inoltre, è presente principalmente nella sua conformazione attiva omodimerica e la sua localizzazione passa da citoplasmatica a mitocondriale (117): tale ri-localizzazione è generalmente un pre-requisito fondamentale per l'attivazione della via apoptotica mitocondriale.

Da questi dati emerge che durante il processo neurodegenerativo, tipico della SLA, il delicato bilancio tra fattori anti-apoptotici e pro-apoptotici si sposti in favore dei secondi. A conferma di ciò, è stato dimostrato che l'iper-espressione di Bcl-2 rallenti la neurodegenerazione e prolunghi la sopravvivenza di topi transgenici SOD1^{G93A} di 3-4 settimane (150). La sopravvivenza dei motoneuroni risulta dalla neutralizzazione dell'attività di Bax e dall'inibizione delle caspasi-1, 9 e 3 (267). Inoltre, Pasinelli e collaboratori hanno osservato che le SOD1 mutanti legano la proteina Bcl-2 nei mitocondri, sia di modelli murini che di pazienti affetti da SLA (201) e ciò fornisce una plausibile spiegazione dell'azione pro-apoptotica della SOD1 nei casi fSLA. È possibile, infatti, che l'interazione tra le SOD1 mutate e Bcl-2 impedisca a quest'ultima proteina di svolgere la sua funzione anti-apoptotica, predisponendo così la cellula all'apoptosi.

In altri studi, è stato dimostrato che la iper-espressione della SOD1^{G93A} richiede l'espressione di Apaf1 per indurre la morte cellulare (59) e che entrambe le forme wt e mutata della SOD1 possono legare Bcl2, fornendo così l'evidenza di un legame diretto tra SOD1 ed entrambe le vie apoptotiche (201).

Studi recenti hanno anche valutato l'espressione dei membri della famiglia Bcl2 nel midollo spinale di topi transgenici SOD1^{G93A}, SOD1^{wt} e non transgenici ed è emerso che Bcl2-A1 è l'unico membro di questa famiglia ad essere up-regolato sia nei topi G93A

asintomatici che sintomatici, attraverso una via indipendente da NF- κ B, con una tendenza a diminuire nelle fasi finali della malattia. È interessante notare che questa iper-regolazione è tessuto-specifica, in quanto il mRNA relativo a Bcl2-A1 non risulta aumentato né nel cervello né nel tessuto muscolare di topi transgenici G93A (63). Inoltre, è stato dimostrato in diverse colture cellulari (NSC-34, cellule ETNA indifferenziate e differenziate e colture primarie da midollo spinale) che l'iper-espressione di Bcl2-A1 e SOD1^{G93A} aumenta il livello di morte cellulare dopo esposizione a TNF- α , situazione che simula la condizione di neuroinfiammazione caratteristica della SLA.

Tra l'altro, è stato osservato nei motoneuroni immortalizzati NSC-34 e nei topi transgenici che esprimono la SOD1 mutata, che l'up-regolazione di Bcl2-A1, indotta dalla presenza della SOD1 mutata, è mediata dall'attivazione del fattore di trascrizione redox-sensibile AP1 e che Bcl2-A1 interagisce con la pro-Caspasi-3 attraverso la sua porzione C-terminale contenente l' α elica 9.

Infine, Bcl2-A1 inibisce l'attivazione della pro-Caspasi-3 nei MNs immortalizzati che esprimono la SOD1 mutata e, quindi, l'induzione di Bcl2-A1 nei topi affetti da SLA rappresenta una strategia di sopravvivenza mirata a contrastare gli effetti tossici della SOD1 mutata (132).

Un altro membro della famiglia Bcl-2 che sembra svolgere un ruolo cruciale nella SLA è Bid. Questa proteina è un potente pro-apoptotico e partecipa al programma di morte cellulare, potenziando la funzione di Bax, sia in maniera diretta che indiretta.

Bid è espresso nel midollo spinale dei topi transgenici SOD1^{G93A} rispetto ai controlli ed è trasformato nella sua forma attiva (tBid) durante la progressione della malattia (118). Recentemente, studi effettuati su topi transgenici SOD1^{G93A} hanno messo in evidenza l'iper-espressione di Bcl2a1, esclusivamente nel midollo spinale di topi sintomatici e asintomatici, con una tendenza a decrescere negli ultimi stadi della malattia. La sovra-espressione di Bcl2a1 è un fenomeno ristretto ai motoneuroni, in quanto non è stata osservata né in altre popolazioni neuronali né nel muscolo.

Tutte queste osservazioni, assieme alle recenti evidenze sui modelli TDP43, che hanno collegato la sua iper-espressione con un aumento della morte cellulare attraverso up-regolazione di espressione di Bim e down-regolazione di BCL-xL (245), supportano la tesi del ruolo primario dell'apoptosi mitocondriale nella SLA. Inoltre suggeriscono che altre vie rilevanti, che regolano l'apoptosi mitocondriale, devono essere studiate per chiarire completamente questo aspetto.

1.7.9 Alterazioni dei Sistemi Cellulari di Difesa allo Stress

Il turnover proteico è un processo essenziale per l'omeostasi cellulare, in quanto è necessario per rimuovere le proteine difettose e fornire alla cellula amminoacidi utili per la sintesi di nuove proteine, specialmente nei momenti in cui c'è assenza di nutrienti. Pertanto, il catabolismo proteico, ha il ruolo di proteggere le cellule dalla presenza di proteine difettose e malripiegate che, se accumulate nel citoplasma cellulare, possono causare stress ossidativo e morte.

Nelle cellule eucariotiche, i principali meccanismi di difesa e di degradazione delle proteine e altri componenti cellulari sono rappresentati dall'*Autofagia* e dal *Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)*.

1.7.9.1 Autofagia

L'Autofagia cellulare è un meccanismo di rimozione selettiva dei componenti citoplasmatici danneggiati, tra cui organelli e proteine, e permette la degradazione nei lisosomi e il riciclo dei componenti cellulari. È responsabile della degradazione delle proteine a lungo termine e del mantenimento del pool di amminoacidi all'interno delle cellule. Inoltre, i meccanismi dell'autofagia sono indispensabili nella clearance degli organelli cellulari, nella presentazione dell'antigene, nell'eliminazione di microrganismi e nella regolazione dello sviluppo e della morte cellulare. Sulla base delle differenti modalità con cui i componenti intracellulari sono degradati, si distinguono tre principali gruppi di autofagia specializzata (86, 186):

- **Macroautofagia:** è considerata una risposta cellulare allo stress che, in condizioni basali, assicura il mantenimento dell'omeostasi neuronale. È il principale meccanismo utilizzato dalle cellule per lo smaltimento di organuli danneggiati o di proteine inutilizzate. Questi vengono inglobati all'interno di una vescicola a doppia membrana, nota come autofagosoma e, dopo fusione con un lisosoma, vengono degradati dagli enzimi lisosomiali. Un autofagosoma può fondersi anche con un endosoma, contenente componenti extracellulari, formando un anfisoma, in un processo noto come eterofagia, poichè aiuta la cellula ad eliminare materiale che deriva dall'ambiente esterno. Anche in questo caso, l'anfisoma si fonde con il lisosoma primario e i componenti sono degradati.

Ogni fase del processo di degradazione prevede l'intervento di specifiche molecole, coinvolte in vari eventi di coniugazione, fosforilazione e defosforilazione. Uno dei modulatori negativi della macroautofagia più conosciuto e ben caratterizzato è mTOR (186, 248). All'interno della macroautofagia sono incluse altre classi distinte per capacità e selettività: mitofagia (si verifica selettivamente nei mitocondri), nucleofagia (nuclei), perossifagia (perossisomi), reticolofagia (RE), xenofagia (microrganismi) e ribofagia (ribosomi).

- ***Microautofagia:*** è il processo responsabile della rimozione selettiva degli organelli cellulari in eccesso. Il materiale citoplasmatico da degradare è direttamente inglobato dal lisosoma attraverso delle invaginazioni ed evaginazioni tubulari della membrana lisosomiale. Diversamente dalla macroautofagia, non sono ancora noti i meccanismi molecolari che regolano questo tipo di autofagia. È risaputo che i lisosomi incorporano direttamente le regioni citoplasmatiche da degradare attraverso un sistema complesso di allungamento ed invaginazione della loro membrana (86).
- ***Autofagia chaperone-mediata (CMA):*** è un processo piuttosto complesso in cui le proteine da degradare si legano ad uno chaperone molecolare, attraverso una specifica sequenza pentapeptide, che le marca e ne consente il riconoscimento e la degradazione nel lisosoma. Un esempio di chaperone molecolare è la Heat shock protein 70 kDa (HSP-70). Il complesso proteina-chaperone è riconosciuto e legato da specifici recettori e, grazie all'intervento di altri chaperoni, è introdotto nel compartimento lisosomiale, dove la proteina è degradata. Questo tipo di autofagia è differente dagli altri sopra elencati poiché trasloca il materiale proteico singolarmente ed è estremamente selettivo riguardo il materiale che deve attraversare la barriera lisosomiale. La CMA è attiva in condizioni fisiologiche in molti tessuti, ma la massima attivazione si verifica in condizioni di stress cellulare. In particolare, fornisce substrati per la sintesi di nuove proteine in condizioni di prolungato deficit nutrizionale e rimuove selettivamente le proteine danneggiate dallo stress ossidativo e da insulti tossici di varia natura (248).

Un indice di induzione autofagica è il turnover della proteina LC3-II, proteina solubile ed ubiquitaria dei tessuti animali e nelle colture cellulari.

LC3 è associata alla membrana dell'autofagosoma ed è prodotta contemporaneamente alla formazione dell'autofagosoma, a partire dal precursore Pro-LC3. Successivamente si lega con una fosfatidiletanolamina e tale complesso si lega, a sua volta, covalentemente al fagosoma, diventando LC3-II (191).

È noto che l'autofagia è essenziale per l'omeostasi neuronale e, in alcuni casi, potrebbe essere protettiva (159). Topi knockout per il gene Atg muoiono prematuramente in seguito ad un'ampia neurodegenerazione e la patologia risulta positiva alle proteine ubiquitinate. Ciò dimostra, quindi, l'importanza dell'autofagia nella neurodegenerazione (149). Tuttavia, quando l'autofagia è indotta in modo eccessivo o in difetto, può risultare in una morte cellulare autofagica (morte cellulare di II tipo), caratterizzata da un massivo accumulo di autofagosomi senza condensazione nucleare (227).

Un numero sempre maggiore di evidenze supporta l'ipotesi che alterazioni autofagiche contribuiscano a differenti patologie neurodegenerative associate ad anomali aggregati citoplasmatici delle proteine mutate (276).

Importanti proteine, tra cui SOD1 e TDP43 sono state identificate all'interno delle inclusioni citoplasmatiche, sia in casi fSLA che sSLA (6, 187). Alcuni studi riportano un'autofagia alterata in topi G93A già dallo stadio pre-sintomatico della malattia. Anche il numero di vacuoli autofagici marcati con LC3 è significativamente aumentato nei motoneuroni del midollo spinale di topi G93A rispetto al gruppo dei topi controllo (291). Tuttavia, non è noto se l'incremento dei vacuoli autofagici nei motoneuroni sia il risultato dell'induzione dell'autofagia o della compromissione del flusso autofagico. Inoltre, mentre gli autofagosomi sono frequentemente osservati nei neuroni che muoiono, è ancora poco chiaro se l'autofagia partecipi attivamente al processo di morte dei motoneuroni nella SLA. Numerose evidenze suggeriscono che difetti del flusso autofagico o di specifici processi regolatori dell'autofagia, piuttosto che la semplice induzione, potrebbero contribuire alla degenerazione motoneuronale (17).

Un recente studio indica che il trattamento di topi G93A con rapamicina inattiva in modo significativo la cascata del segnale di mTOR, causa ulteriori accumuli di vacuoli autofagici, e fallisce nel ridurre i livelli di aggregati della SOD1 mutata nel midollo spinale di topi transgenici G93A. Questo studio mostra la possibilità che un anomalo meccanismo dell'autofagia potrebbe contribuire alla degenerazione motoneuronale nella SLA.

1.7.9.2 Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)

Accanto all'autofagia, un altro importante meccanismo cellulare per la clearance delle proteine alterate è rappresentato dal Sistema UPS. Sebbene la sua funzione sia simile a quella del lisosoma, differisce da esso per alcuni motivi, tra cui la natura citologica e il tipo di composti che produce.

In particolare, il proteasoma è un complesso proteico atto a degradare i peptidi, mentre il lisosoma è un compartimento cellulare dotato di membrana cellulare e deputato alla degradazione di svariate sostanze tramite l'azione di acidità ed enzimi proteolitici. Esso è un complesso multienzimatico necessario per la degradazione delle proteine strutturalmente alterate o di proteine a breve termine.

Ogni proteasoma è costituito da una subunità centrale (chiamata 20S) che svolge l'attività proteolitica ed è formata da 4 anelli costituiti, a loro volta, da 7 subunità ciascuno. I due anelli centrali catalitici sono chiamati β , mentre i due laterali α (191). Ogni subunità 20S, poi, può legare ad entrambe le estremità un'ulteriore subunità, detta 19S, andando a formare il proteasoma 26S, oppure PA28 (formato da PA28 α e PA28 β) che, sostituendo 19S, aumenta l'attività del complesso (55).

Sia PA28 che 19S sono subunità regolatorie che mirano a controllare l'attività del proteasoma. La loro localizzazione è importante per degradare le proteine in modo corretto.

Molte proteine che sono destinate alla degradazione nel Sistema UPS, sono coniugate covalentemente ad un numero di molecole di ubiquitina.

L'ubiquitina è un peptide di 76 amminoacidi (3 ripetuti), altamente conservato negli eucarioti (nei procarioti non è presente). Nelle cellule funziona da marcatore di proteine da degradare nella via proteasomiale. La sua attivazione avviene grazie al legame con l'enzima E1 (enzima attivatore dell'ubiquitina) e, successivamente, viene trasferita all'enzima E2 (enzima coniugatore dell'ubiquitina), dal quale può passare alla proteina bersaglio o, nella maggior parte dei casi, ad un ulteriore enzima, detto E3 (ubiquitina ligasi), che catalizza l'attacco al polipeptide da degradare. L'ubiquitina è quindi una proteina regolatoria.

La via proteolitica proteasomiale inizia nel citosol, dove le proteine da degradare vengono riconosciute dall'enzima ubiquitinante, e si articola in due fasi principali (54).

Nella *prima fase* si ha la coniugazione del gruppo amminico di un residuo di lisina della proteina target con il C-terminale della molecola di ubiquitina. A questo ne seguono molti altri, in modo da avere una proteina bersaglio che presenti numerosissime ramificazioni, rappresentate da residui di ubiquitina. Tale legame è catalizzato da una serie di tre specifiche attività enzimatiche e rappresenta una sorta di segnale di riconoscimento per il trasporto della proteina al proteasoma, grazie all'azione di specifici chaperoni molecolari. Tuttavia, piccole proteine e frammenti peptidici possono essere degradati dal Sistema UPS, senza essere marcati con la sequenza di ubiquitina.

Il polipeptide viene così riconosciuto dalle subunità α del proteasoma, che tramite l'idrolisi di ATP, permette l'ingresso della proteina ed un suo corretto dispiegamento all'interno della struttura. Contemporaneamente, le molecole di ubiquitina vengono rimosse e liberate nel citosol per essere riutilizzate. Il prodotto finale della degradazione è una serie di peptidi di 6-10 amminoacidi di lunghezza, corrispondenti alla distanza dei siti proteolitici all'interno del proteasoma. Questa lisi dei polipeptidi in amminoacidi singoli è la seconda differenza fondamentale rispetto al lisosoma.

L'aggiunta dell'ubiquitina (Ub) alla proteina bersaglio si articola in tre stadi principali (55, 54):

Stadio 1. L'enzima attivante E1 attiva l'Ub in una reazione ATP-dipendente in modo da formare un intermedio tioestere ad alta energia, Ub-E1-S, in cui il carbossile della glicina terminale dell'Ub si lega ad un residuo di cisteina presente sull'enzima E1;

Stadio 2. L'enzima coniugante E2 trasferisce l'Ub, attivata precedentemente dal E1, su un'altra cisteina presente nel suo sito attivo, attraverso una reazione di trans-tio-esterificazione. Si forma così un secondo intermedio ad alta energia, Ub-E2-S, legato successivamente dall'enzima E3.

Stadio 3. Un terzo enzima, l'ubiquitina-proteina ligasi (E3), catalizza l'ultima fase del processo di coniugazione dell'ubiquitina. Questo enzima è in grado di interagire con E2 e lega covalentemente l'Ub al substrato che deve essere eliminato. Approssimativamente mille differenti enzimi E3 sono stati identificati nel genoma umano (54) e la loro variabilità garantisce estrema specificità di substrato all'intero processo. Nello specifico, l'enzima E3 trasferisce la molecola di Ub ad un gruppo amminico di un residuo di lisina interno alla proteina, generando un legame covalente

iso-peptide. In alcuni casi, tuttavia, l'Ub è coniugata linearmente con il gruppo amminico libero dell'estremità N-terminale. Successivamente, alla Ub legata con la lisina viene aggiunto una sequenza di poli-Ub. Il segnale di degradazione, riconosciuto dal complesso 26S del proteasoma, è costituito da una catena di poli-Ub legato al residuo Lys 48. La coniugazione ad altri residui di Lys (es. Lys 63) ha funzione non-proteolitica, tra cui l'attivazione della trascrizione.

Nella *seconda fase* della via proteolitica, mediata dal proteasoma, avviene la degradazione del substrato poli-Ub ad opera del complesso 26S del proteasoma. Il proteasoma è una grande proteasi multicatalitica che degrada le proteine poli-Ub a piccoli peptidi. È composto da una particella minore (CP) 20S che contiene il sito catalitico ed una particella regolatoria (RP) 19S. La particella 20S è una struttura circolare composta da 4 anelli circolari: due anelli α identici esterni e due anelli β identici interni alla struttura, ognuno composto da sette distinte subunità che conferiscono alla particella 20S la struttura generale di α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7. Il sito attivo del proteasoma è costituito da residui di treonina attivi che appartengono ad alcune subunità β dell'anello centrale. Queste treonine sono responsabili del taglio proteolitico per la disposizione del loro gruppo idrossilico. Grazie alle differenze tra le varie subunità β , il taglio proteolitico può avvenire vicino ad un amminoacido idrofobico, basico o acido. Per prevenire il danno cellulare, le subunità β sono sintetizzate come precursori inattivi (pre- β), con un peptide addizionale all'estremità N-terminale e, solo dopo il completo assemblaggio dei due anelli, saranno attivate mediante taglio proteolitico del peptide (192, 55). All'interno di ciascuna cellula, la popolazione di proteasomi potrebbe essere eterogenea. Molti dei complessi 20S sono racchiusi da due complessi 19S, uno per ogni estremità. Tuttavia, potrebbero avere un complesso minore 19S ad una estremità e differenti complessi, tra cui PA28, all'altra estremità. Il riconoscimento di una proteina bersaglio da parte del proteasoma non è specifica poichè il sistema proteolitico riconosce solo le proteine che sono state precedentemente coniugate al motivo di poli-Ub. Successivamente, e con dispendio di energia, la proteina bersaglio viene "srotolata" e degradata. Dopo la proteolisi, le molecole di poli-Ub subiscono una de-polimerizzazione per essere riciclate. Questa fase è mediata da una famiglia di proteine, denominate DUBs (55).

Concludendo, l'autofagia e l'UPS sono stati da sempre considerati come due sistemi indipendenti e paralleli, ora invece è noto che sono ben coordinati tra loro.

Differenti regolatori sono stati identificati come mediatori tra i due sistemi e tra questi c'è il sequestosoma p62, una proteina citosolica che regola la formazione dell'aggresoma. La p62 interagisce con le proteine ubiquitinate, che sono state marcate ma potrebbero non essere state eliminate dal UPS per la degradazione autofagica, attraverso il legame tra la porzione C-terminale associata alla Ub e la sua sequenza di riconoscimento LC3. I livelli di p62 aumentano in numerose condizioni, come nello stress ossidativo, nel danno al proteasoma e nell'accumulo eccessivo di proteine mal-ripiegate. È stato anche riportato che la p62 è localizzata negli aggregati della SOD1 positivi per l'Ub nei casi fSLA esprimenti la forma mutata della SOD1.

1.7.9.3 Sistema di Risposta alle Proteine non ripiegate (UPR)

Il Reticolo Endoplasmatico (RE) è responsabile della sintesi proteica, della trasformazione post-traduzionale, del ripiegamento delle proteine appena sintetizzate e, infine, del trasporto delle proteine biologicamente attive verso i propri siti target.

Normalmente il corretto ripiegamento proteico è garantito da chaperoni molecolari (chaperonine), foldasi e lectine.

Le alterazioni intracellulari causate da una varietà di fattori stressanti, come la carenza del glucosio, l'anomala regolazione del calcio, l'infezione virale e l'ipossia, possono modificare il ripiegamento proteico portando all'accumulo di proteine mal-ripiegate e, di conseguenza, indurre lo stress del RE.

Quindi il RE, per conservare il suo normale equilibrio fisiologico, richiede l'attivazione del "Sistema di risposta alle proteine mal-ripiegate" (UPR - Unfolded protein response) che mira a ripristinare il RE e l'omeostasi cellulare.

Se l'UPR non riesce a ripristinare l'integrità cellulare, vengono attivati i segnali a cascata della morte cellulare e la cellula va incontro ad apoptosi (172). In particolare, quando il corretto ripiegamento non può essere ripristinato, le proteine ripiegate in modo errato sono destinate alle *vie di degradazione associate al RE* (ERAD - Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) per il loro processamento e, se le proteine non ripiegate o mal-ripiegate continuano ad accumularsi, negli eucarioti viene attivato l'UPR.

Esso svolge tre funzioni: adattamento, allarme e apoptosi. Durante l'adattamento, l'UPR cerca di ristabilire il corretto ripiegamento proteico, inducendo l'espressione di chaperonine, che migliorano il ripiegamento stesso. Contemporaneamente, viene

attenuata la traduzione per ridurre il carico complessivo di ripiegamenti nel RE, mentre aumenta la velocità di degradazione delle proteine non ripiegate. Se questi passaggi falliscono, l'UPR induce un allarme cellulare e attiva il processo apoptotico mitocondriale (8).

L'UPR è un complesso programma di segnalazione cellulare mediato da tre recettori transmembrana del RE:

- proteina chinasi PERK (PKR-like ER Kinase) attivata da RNA a doppio filamento;
- enzima *IRE1* (*inositol*-requiring protein-1);
- fattore di attivazione trascrizionale (ATF6).

Questi sono i principali indicatori di stress del RE che rilevano l'accumulo di proteine non ripiegate.

IRE1 e PERK sono proteine transmembrana di tipo I con attività chinastica, mentre ATF6 è una proteina transmembrana di tipo II, il cui dominio citosolico può traslocare al nucleo ed attivare i geni rilevanti per l'UPR (173).

L'attivazione dei tre trasduttori transmembrana dello stress è regolata da GRP78, noto anche come Bip o HSPA5, regolatore principale dello stress del RE, grazie al suo ruolo di chaperone con proprietà anti-apoptotiche e alla sua capacità di controllare l'attivazione del UPR (8, 269).

GRP78 normalmente è legato a PERK, IRE e ATF6, e blocca la loro attivazione. In caso di stress del RE, esso viene rilasciato dai trasduttori transmembrana del RE, portando all'attivazione dell'UPR stesso.

Dopo la dissociazione da GRP78, la PERK dimerizza per promuovere la sua autofosforilazione ed attivazione. La PERK attivata fosforila il fattore 2a di inizio della traduzione degli eucarioti (eIF2a) per attenuare la velocità di inizio delle traduzioni, prevenendo, quindi, ulteriori sintesi proteiche. Inoltre, il rilascio di ATF6 consente la sua traslocazione dal RE al Golgi, dove viene tagliato. La forma clivata di ATF6 migra nel nucleo e funziona da fattore di trascrizione per l'up-regolazione di alcune proteine che aumentano la capacità di ripiegamento del RE. Tra queste emergono le chaperonine GRP78 e GRP94, e gli enzimi ripieganti, quali PDI. La IRE1 attivata ha, invece, attività endoribonucleasica ed interviene nello splicing di un introne di 26 basi dall' mRNA che codifica la proteina X-box binding 1 (XBP-1). Tale proteina (XBP-1) è un fattore trascrizionale dei geni bersaglio DnaJ, p58, ERdj4, EDEM e PDI, tutti coinvolti nel ripiegamento delle proteine e nella ERAD (173, 269).

L'UPR, attraverso l'attenuazione transitoria della traduzione e l'induzione della trascrizione delle chaperonine del RE, degli enzimi ripieganti e delle proteine coinvolte nella ERAD, funziona come risposta adattativa cellulare per ridurre l'aggregazione di proteine mal-ripiegate nel RE. Tuttavia, in condizioni di intenso e prolungato stress del RE, l'UPR attiva vie uniche e specifiche che portano alla morte cellulare attraverso l'apoptosi. In particolare, in caso di stress del RE, la proteina BH3 pro-apoptica BAX = BAK subisce un cambiamento conformazionale nella membrana del RE e stimola l'efflusso di ioni Ca^{2+} verso il citosol, dove attivano la m-calpaina e successivamente stimolano l'attivazione, mediante taglio proteolitico, della pro-Caspasi 12 con conseguente attivazione a cascata delle Caspasi ed apoptosi cellulare (269).

1.8 Diagnosi

Purtroppo, ancora oggi, la diagnosi della SLA è molto difficoltosa, richiede diverse indagini mediche e in ogni paziente l'evoluzione può essere valutata solo attraverso il controllo neurologico periodico (ogni 2-3 mesi), poiché non esiste un esame specifico con elevata accuratezza diagnostica e prognostica.

Pertanto, la diagnosi di SLA avviene per esclusione di altre patologie. Il neurologo esegue un'anamnesi completa del paziente affetto da SLA e prescrive indagini mediche e valutazioni ripetute nel tempo, in un percorso diagnostico che prevede test neurologici ed esami strumentali, per valutare se i sintomi del paziente, quali debolezza ed atrofia muscolare, iperreflessia e spasticità stiano progressivamente peggiorando.

Sono indispensabili e vengono utilizzati come supporto diagnostico:

- l'**Elettromiografia (EMG)**, che consente la valutazione della funzionalità dei nervi e dei muscoli periferici. È uno strumento diagnostico che permette di inquadrare le malattie neurologiche del Sistema Nervoso Periferico (SNP) a carico di radici nervose, plessi nervosi, nervi periferici, placca neuromuscolare e muscoli. Se l'esame neurologico evidenzia un deficit a carico del SNP, l'elettromiografia rappresenta un mezzo indispensabile per approfondire la diagnosi, soprattutto quando non sono chiare la sede di lesione, l'entità e il tipo di lesione;
- la **Risonanza Magnetica Nucleare (RMN)**, in particolare lo studio del sistema piramidale. Il fenomeno della RMN si basa sulla capacità di alcune molecole (soprattutto quelle della parte liquida intra ed extracellulare) di passare, se sottoposte all'azione di un campo magnetico, da un determinato livello energetico ad un altro ("situazione basale"). L'applicazione di un secondo campo magnetico, che abbia direzione diversa dal primo, comporta un'ulteriore modificazione della situazione energetica e il raggiungimento di uno "stato di eccitazione". Il ritorno alle condizioni "basali", che si ottiene interrompendo l'applicazione del secondo campo magnetico, si traduce in una cessione di energia, che può essere valutata con la misurazione di alcuni parametri, chiamati "tempi di rilassamento", con conseguente ritorno ai valori energetici primitivi. L'assorbimento e la successiva cessione di energia possono essere tradotti graficamente e quindi elaborati sotto forma di immagini, grazie all'ausilio di speciali e sofisticate apparecchiature;

- la **Imaging a Risonanza Magnetica (MRI)**, tecnica di generazione di immagini basata sul principio fisico della RMN. Anche se le immagini MRI sono spesso normali nei pazienti SLA, essa rivela la presenza di altri problemi che possono causare sintomi simili alla SLA. È una tecnica diagnostica non invasiva, fondata sul principio delle onde radio, che consente una precisa visualizzazione degli organi e delle strutture interne, senza che vengano utilizzate radiazioni ionizzanti o mezzi di contrasto;
- la **PET (Tomografia ad Emissione di Positroni)**, che consente lo studio del metabolismo funzionale delle diverse aree cerebrali;
- **Tests su sangue periferico ed urine** eseguiti per escludere la possibilità di altre patologie.

Notevoli progressi si stanno facendo nel campo della diagnostica strumentale. Mentre i metodi tradizionali di **Risonanza Magnetica (RM)** vengono utilizzati principalmente per escludere patologie simili alla SLA, diverse tecniche di RM, come la **morfometria voxel-based**, hanno consentito di identificare le modificazioni cerebrali indotte dalla patologia. Anche l'impiego della **Spettroscopia con Risonanza Magnetica (H-MRS)**, tecnica ancora in sviluppo, è in grado di dare, almeno potenzialmente, un certo supporto diagnostico, essendo una tecnica non invasiva in grado di investigare la presenza di sostanze chimiche in un determinato volume del cervello in vivo. Inoltre, la **PET** ha dimostrato recentemente di avere le potenzialità per permettere di diagnosticare precocemente la malattia in maniera piuttosto accurata.

In Italia esistono alcuni centri clinici specializzati per le diagnosi di SLA, accreditati per la certificazione e la definizione del piano terapeutico assistenziale per la malattia (D.M. 279/2001).

La SLA deve essere differenziata dalle “ALS-mimic-syndromes”, disordini non correlati, che possono avere sintomi clinici simili alla SLA o alle sue varianti. Infatti, malattie neurologiche quali la Sclerosi Multipla, l'Atrofia Muscolare Spinale, la Sindrome Post-Poliomielitica, la Neuropatia Multifocale Motoria e l'Atrofia Muscolare Spinale e Bulbare, possono presentare alcuni aspetti comuni alla SLA e quindi risulta necessario considerarle durante il processo diagnostico. Le manifestazioni cliniche della SLA possono anche somigliare ad alcune malattie infettive virali, come quelle indotte dal virus per l'Immunodeficienza Umana (HIV), dal virus per la Leucemia delle cellule T umane (HTLV), la Malattia di Lyme, la Sifilide e l'Encefalite da virus a RNA Tick Borne (TBEV).

Nonostante tutte queste difficoltà nell'indagine diagnostica, sono stati compiuti numerosi progressi. Negli ultimi anni, ad esempio, sono state identificate tre proteine nel fluido cerebro-spinale di pazienti affetti da SLA la cui concentrazione risulta essere significativamente ridotta. Queste tre proteine rappresentano, ad oggi, i primi marcatori che potrebbero essere utilizzati per diagnosticare la SLA con un'accuratezza del 95% (95).

Da tutto ciò emerge la grande necessità di individuare un approccio diagnostico specifico per la SLA, basato su tecniche non invasive ed attendibili e che consentano una maggiore certezza di diagnosi nelle fasi precoci della malattia.

Per definire i livelli di certezza diagnostica si fa riferimento ai cosiddetti criteri *El Escorial (revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Brooks BR et al. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000 Dec;1(5):293-9)*, secondo i quali si può parlare di:

- ✓ **SLA sospetta:** segni di interessamento del II motoneurone in due distretti corporei;
- ✓ **SLA possibile:** presenza di segni clinici di compromissione del I e II motoneurone in un solo distretto corporeo e segni del II motoneurone posti all'estremità anteriore o cefalica rispetto a quelli del I;
- ✓ **SLA probabile:** segni clinici di compromissione del I e II motoneurone in almeno 2 distretti corporei;
- ✓ **SLA definitiva:** segni clinici di compromissione del I e II motoneurone in 3 regioni. Fondamentale è la presenza di segnali centrali e periferici nella stessa regione.

1.9 Terapia

Non esistono al momento terapie farmacologiche efficaci in grado di arrestare o rallentare significativamente la progressione della SLA. Ad oggi, l'unico farmaco disponibile è il **Riluzolo (Rilutek, Sanofi-Aventis)**, approvato dalla FDA: è un farmaco neuro-protettivo che blocca la neurotrasmissione glutamatergica nel SNC, ma mostra benefici terapeutici limitati nei pazienti, in quanto rallenta il decorso della malattia solo di alcuni mesi, non avendo alcun effetto sul tono muscolare, sulla qualità della vita o sulla capacità funzionale (78, 175).

Pertanto, emerge un grande interesse nell'individuare terapie più efficaci e con maggiore beneficio per i pazienti SLA.

Finora differenti farmaci con azioni antiossidanti sono stati testati per rallentare la progressione della SLA, tuttavia molti di questi non hanno dato esiti positivi (189).

In particolare, la Vitamina E ha mostrato un effetto positivo sulla riduzione del rischio per la SLA (101) ma, quando usata in aggiunta alla terapia con Riluzolo, fallisce nel rallentare la progressione della malattia (113). Tuttavia, è stato osservato che la combinazione di Vitamina E e acidi grassi polinsaturi riduce il rischio di sviluppare la SLA (263).

L'Edavarone esercita un effetto protettivo sui neuroni e rappresenta ad oggi uno dei possibili nuovi farmaci per la SLA (247), contrariamente all'omega 3 acido eicosapentaenoico (EPA) che sembra accelerare la progressione della malattia (289).

Numerose molecole anti-ossidanti, come l'acetilcisteina e la creatina non hanno effetto significativo sulla sopravvivenza dei pazienti SLA, mentre la melatonina è utilizzata come potenziale composto neuroprotettivo.

Ad oggi, lo sviluppo di approcci terapeutici efficaci per la SLA è stato deludente. Negli ultimi anni, diversi studi sono stati condotti per comprendere meglio i meccanismi molecolari alla base del processo degenerativo e, quindi, identificare nuovi targets terapeutici e nuove aree terapeutiche (180).

Tra questi possiamo ricordare:

- le **Tecnologie basate sulle Cellule Staminali** rappresentano una strategia promettente per il trattamento della SLA. La plasticità di sviluppo delle cellule staminali, per esempio, l'abilità di cambiare il loro destino in risposta a segnali extracellulari, ha migliorato le performances dei trials basati sull'utilizzo di

cellule staminali nei pazienti SLA. È stato riportato che il trapianto di cellule staminali mesenchimali autologhe nel midollo spinale di pazienti SLA è sicuro e ben tollerato (170). Comunque, in studi preliminari, il trapianto di cellule staminali in pazienti SLA ha prodotto risultati discordanti, inclusa l'efficacia del trapianto stesso (234). Desta molto interesse la dimostrazione che un nuovo tipo di cellule staminali pluripotenti, denominato "induced pluripotent stem cells", può essere generato da cellule somatiche, quali i fibroblasti, introducendo i fattori di trascrizione Oct3/4, Sox2, Klf4 e C-myc (286). Inoltre, l'osservazione che questo tipo di cellule staminali pluripotenti può essere indotto a differenziarsi in motoneuroni ha portato nuova speranza per la SLA (144). Tuttavia, l'ipotesi che questi motoneuroni convertiti possano influire con successo sulla SLA necessita di ulteriori validazioni (171);

- l'**RNAi**: un processo attraverso cui microRNA non codificante (miRNA) inibisce e regola l'espressione genica legando l'mRNA (84). Molte malattie neurodegenerative ereditarie sono state trattate con la terapia RNAi, inclusa la SLA (235). La soppressione genica può essere indotta con tecniche basate su oligonucleotidi come la RNAi e AONs. Questi metodi sono stati testati solo con due geni, SOD1 e Fas, e sono stati riportati importanti risultati in modelli animali (191). Il solo tentativo in pazienti con fSLA, caratterizzati da mutazione SOD1, venne iniziato nel 2010 da Isis Pharmaceuticals e prevedeva l'introduzione di un inibitore per la SOD1 direttamente nel fluido cerebrospinale. I principali limiti di queste nuove strategie farmacologiche sono rappresentati dalla difficoltà dei regolatori genici di giungere alle cellule targets, per la presenza della barriera emato-encefalica, e di ottenere farmaci con effetto a lungo termine (16);
- la **Terapia Genica con Vettori basati su AAV e Lentivirus** si sta dimostrando particolarmente efficace per il trattamento di disordini neurologici (15). Questi vettori sono interessanti per la loro semplicità e per la loro alta efficienza di trasduzione per i neuroni (71). Inoltre, sono stati impiegati per trasportare fattori

cruciali per la sopravvivenza neuronale, quali IGF-1, G-CSF, ANG o NT-3. Questi metodi non sono soltanto testati in modelli di piccoli animali, in particolare topi, ma anche in grandi animali, come gatti e scimmie (162).

Tutti questi nuovi approcci hanno mostrato risultati abbastanza promettenti, sebbene sia necessario svolgere ulteriori prove sperimentali per ottenere terapie efficaci per i pazienti affetti da SLA (191).

Nel mese di Luglio 2017, l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ha approvato l'introduzione in Italia del **Radicut**, nome commerciale dell'Edaravone, un nuovo farmaco contro la SLA. L'AIFA ha dato così riscontro positivo alla richiesta formale avanzata dalla AISLA, Associazione Italiana Sclerosi Laterale Amiotrofica, attestando il nostro Paese come il primo in Europa ad avere un nuovo farmaco sulla SLA in commercio dopo più di vent'anni. Infatti, come detto precedentemente, l'unico farmaco approvato per la SLA, nel 1995, era stato il Rilutek che ha dimostrato una modesta efficacia nel prolungare di pochi mesi la sopravvivenza dei pazienti. Il Radicut risulta essere in grado di rallentare moderatamente la degenerazione motoria causata dalla malattia.

Il Radicut, inizialmente messo a punto in Giappone per il trattamento degli ictus, è stato oggetto negli anni di ripetuti studi sulla SLA. I primi risultati non furono incoraggianti: non registravano, di fatto, alcuna differenza significativa tra i pazienti trattati con l'Edaravone e quelli trattati con il placebo. In altri casi, addirittura, si sono verificati importanti effetti collaterali. Analizzando i dati, tuttavia, i ricercatori hanno notato che una determinata popolazione esaminata mostrava una risposta interessante al farmaco ed è su questa specifica tipologia di pazienti che si sono concentrate le sperimentazioni successive. Il recente studio, condotto negli Stati Uniti su 137 pazienti affetti da SLA e pubblicato su *Lancet Neurology* a Maggio 2017, ha confermato questo aspetto peculiare (277).

Il Radicut induce un lieve rallentamento del declino funzionale in pazienti SLA con specifiche caratteristiche, quali la comparsa della malattia da non oltre due anni, una disabilità moderata e, infine, una buona funzionalità respiratoria. Per tale ragione il farmaco potrà essere prescritto dal neurologo di riferimento esclusivamente alle persone con questo specifico quadro clinico. In Italia, su una popolazione di circa 6.000 persone affette da SLA, si stima che i pazienti inizialmente idonei siano circa 1.600.

L'AIFA ha inserito il Radicut nell'elenco dei medicinali erogabili a totale carico del Servizio Sanitario Nazionale, ai sensi della *Legge 23 dicembre 1996, n. 648, per il trattamento della Sclerosi Laterale Amiotrofica*. Tale farmaco, dunque, è stato inserito tra i cosiddetti “medicinali innovativi” per il trattamento terapeutico di patologie che, come la SLA, sono prive di adeguata cura. Si tratta di farmaci già in commercio in altri Stati ma non sul territorio nazionale perché, pur avendo superato tutte le prove relative alla sicurezza e sopravvivenza, sono ancora soggetti a sperimentazione clinica.

La decisione dell'AIFA, avvenuta dopo un'approfondita ed attenta valutazione delle evidenze scientifiche disponibili e pubblicate su *Lancet Neurology* (*) a Maggio 2017, ha fatto seguito alla richiesta da parte dell'ASLA di rendere disponibile il Radicut agli ammalati italiani.

Il Radicut oggi è in uso in Giappone e Corea del Sud, mentre una sperimentazione con Edaravone per via orale è in corso in Olanda. Nel Maggio 2017 la FDA (*Food and Drug Administration*) ne ha autorizzato l'uso negli Stati Uniti.

1.10 La Ricerca sulla SLA in Italia e nel Mondo

Come già anticipato, la SLA è una malattia ad eziologia multifattoriale e con patogenesi complessa, determinata dal concorso di molteplici fattori di rischio ambientali e/o predisposizione genetica. Per questa ragione, la ricerca si sta concentrando su diversi fronti e, negli ultimi anni, sono stati compiuti importanti passi in avanti sulla conoscenza della malattia e sulla comprensione delle sue basi biologiche. L'obiettivo finale è individuare strategie terapeutiche efficaci ed identificare nuovi e affidabili marcatori, fondamentali sia per la diagnosi che per la definizione della progressione. Inoltre, data l'elevata eterogeneità della malattia, i marcatori potrebbero essere utilizzati anche a supporto di un reclutamento omogeneo dei pazienti per gli studi clinici.

Genetica: importanti risultati sono stati ottenuti dagli studi genetici, che hanno portato alla scoperta di nuove mutazioni causative della patologia. Negli ultimi anni, la comunità scientifica italiana ha contribuito in maniera significativa alla scoperta di molte delle nuove mutazioni identificate, grazie ad importanti collaborazioni internazionali. In particolare Fondazione AriSLA, attraverso il finanziamento dei progetti EXOMEFALS, NOVALS (56, 76) e SARDINIALS (208), ha contribuito all'identificazione delle mutazioni nei geni Profilin-1 nel 2012 (278), TUBA4A nel 2014 (235), Matrin-3 nel 2014 (136) e TBK1 nel 2015 (56).

Infiammazione e immunità nel sistema nervoso: il ruolo della neuroinfiammazione nella SLA si è dimostrato recentemente di fondamentale importanza, anche se di grande complessità (127). Notevoli passi avanti si sono compiuti in questo campo, sia su modelli in vitro ed in modelli animali (100), sia negli studi clinici che coinvolgono i pazienti SLA.

Cellule staminali: in tutto il mondo si stanno compiendo numerosi studi sull'utilizzo di cellule staminali, sia come modello di malattia che come possibile terapia. La possibilità che queste cellule, una volta trapiantate, siano in grado di formare proiezioni assoniche a grandi distanze (dal cervello al midollo spinale e dal midollo spinale ai muscoli) e ricostruire connessioni funzionali risulta essere, tuttavia, una sfida molto ardua, vista la complessità del SNC e l'ostilità dell'ambiente ricevente, nel quale le cellule nervose native stanno morendo in un contesto di infiammazione cronica. Una valida alternativa terapeutica è che le cellule staminali trapiantate agiscano con funzione di supporto alla sopravvivenza dei motoneuroni esistenti.

In tutto il mondo sono in corso trial clinici con molecole e terapie biologiche avanzate: in particolare, ad oggi sono stati registrati 314 trial sulla SLA e, di questi, ne sono attivi 109 di cui 42 osservazionali e 67 interventistici (282). Per "trial clinico" si intende uno studio farmacologico, biomedico o salute-correlato sull'uomo, che segue dei protocolli predefiniti. Lo scopo ultimo è quello di verificare che una nuova terapia sia sicura, efficace e migliore di quella normalmente impiegata e correntemente somministrata.

I trial clinici possono essere di 4 tipi:

- ✓ **trial di Fase I e di Fase II** controllano la sicurezza di un farmaco o di un trattamento e hanno l'obiettivo di accertarsi che essi non siano dannosi per i pazienti;
- ✓ **trial di Fase III** sono mirati a determinare l'efficacia dei trattamenti, al fine di poterli sviluppare in una terapia che possa essere ampiamente disponibile;
- ✓ **trial di Fase IV** sono definiti di farmacovigilanza e rappresentano tutte quelle azioni di monitoraggio e controllo di un nuovo farmaco immesso nel mercato.

In ambito SLA, gli studi attivi sono in particolare di Fase II e di tipo interventistico, ovvero studi che valutano interventidi tipo esterno diagnostico, terapeutico o riabilitativo non previsto dalla normale pratica clinica. Tali studi si possono distinguere in studi di molecole/farmaci, studi basati sull'utilizzo di terapie cellulari (cellule staminali) e studi di tipo supportivo (ventilazione, supporto muscolare e training).

Gli studi interventistici ad oggi più numerosi sulla SLA sono quelli che testano diverse molecole e/o farmaci che mirano a migliorare il decorso della patologia.

Le molecole/farmaci in esame si possono distinguere in diverse categorie, sulla base del meccanismo cellulare che si pensa sia coinvolto nella SLA:

- **Molecole che agiscono sul processo infiammatorio e sul sistema immunitario.** Numerose ricerche di base hanno dimostrato infatti il coinvolgimento di questi due processi nell'insorgenza e nello sviluppo della malattia;
- **Molecole che agiscono sull'eccitotossicità,** un fenomeno di tossicità neuronale conseguente all'esposizione a concentrazioni relativamente alte di glutammato. Il fenomeno risulta particolarmente importante perché il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio a livello del SNC. Tutte le molecole agiscono riducendo il rilascio di glutammato o direttamente oppure agendo su determinati recettori e canali che ne riducono il rilascio o ne aumentano la rimozione;
- **Molecole antiossidanti,** che agiscono sui processi di stress cellulare dovuti al danno ossidativo, come l'Edaravone e la Mecobalamina;
- **Molecole chaperone e molecole deputate alla rimozione degli aggregati proteici.** L'alterazione nella rimozione delle proteine è stata proposta come possibile meccanismo neurotossico coinvolto nella SLA. In questo ambito si ricordano i trial con l'Acrimoclomolo e la Memantina. È presente anche uno studio in cui si testa un nuovo metodo terapeutico per il blocco dell'espressione di proteine alterate nella patologia, basato su oligonucleotidi antisenso. L'ISIS 333611 sfrutta questo principio e si lega alla proteina SOD1: il metodo è risultato sicuro in fase II e si stanno iniziando studi di efficacia;
- **Molecole chelanti il ferro:** gli studi si basano sull'ipotesi che l'eccesso di metalli pesanti nel SNC potrebbe contribuire alla patologia. Un esempio di queste molecole chelanti è il Deferiprone;
- **Molecole neuroprotettive,** molecole nuove o già in uso per altre patologie che possono avere un effetto neuroprotettivo: ad esempio, molecole che sono coinvolte nella crescita assonale o che intervengono come potenziale contrasto nell'attività delle neurotossine;
- **Molecole che agiscono nel facilitare la contrazione muscolare,** come il Tirasetimiv;

- **Combinazione di farmaci per contrastare la malattia a diversi livelli**, come lo studio “*Creatine, minocycline, celecoxib: selection design study multiple drugs*”, che mira anche a ridurre i tempi nella ricerca del principio attivo efficace;
- **Farmaci che cercano di controllare i sintomi della malattia**, come il Nuedexta. Il farmaco, una combinazione di chinidina e destrometorfano, intende agire sulla progressione della malattia a livello delle funzioni bulbari, della fonazione e della deglutizione.

Si aggiungono, infine, i trial iniziati in diverse parti del mondo che vedono coinvolte le cellule staminali, con l’obiettivo a lungo termine di rigenerare, o più verosimilmente proteggere, le funzioni dei motoneuroni.

Pur non portando ancora a ricadute concrete per i pazienti, i trial clinici attivati fino ad oggi hanno dato un contributo prezioso per lo sviluppo della ricerca sulla malattia, in particolare per lo studio di biomarcatori diagnostici e prognostici. Inoltre, alcuni di essi stanno avendo risultati promettenti in Fase II (ossia di valutazione della sicurezza) creando i presupposti per lo studio di Fase III di valutazione dell’efficacia. Tra questi si ricordano gli studi sulle molecole neuroprotettive, sullo stress ossidativo, sul ruolo del glutammato nella SLA e sull’analisi dei processi infiammatori e dei meccanismi immunitari.

Occorre sottolineare che l’attivazione di uno studio clinico contribuisce anche a sviluppare sinergie e collaborazioni tra i centri clinici coinvolti, permettendo la condivisione della conoscenza e delle informazioni raccolte dai pazienti, così da rendere più rapido il passaggio dei dati di ricerca alla pratica clinica.

Dal punto di vista scientifico, infine, i trial effettuati hanno permesso di comprendere che in futuro dovranno essere superate nuove sfide, non solo per avere risultati promettenti ma anche per rivalutare quelli passati. A seguito dell’analisi dei dati ottenuti, infatti, sono in corso interessanti dibattiti tra gli esperti affinché il disegno dei trial clinici sia massimizzato a dare risposte. Una recente review, pubblicata nel 2014 da *Mitsumoto H. et al. su Lancet Neurology* (176), sottolinea e riassume quali possono essere tali sfide, a partire dall’osservazione clinica sull’eterogeneità delle manifestazioni della malattia, il cui decorso, la velocità di progressione e la gravità variano sensibilmente da paziente a paziente.

La presenza di queste problematiche ha evidenziato sempre più la necessità di avere dei biomarcatori specifici di malattia (sia diagnostici che prognostici), per la corretta stratificazione dei pazienti da arruolare in trial clinici e per una corretta interpretazione dei risultati stessi.

1.11 Le Nanoparticelle di Ossido di Cerio (Nanoceria)

Il Cerio (Ce) è un elemento chimico metallico ed argenteo della tavola periodica, con numero atomico 58. Si tratta di un metallo duttile, di colore bianco-argenteo che si ossida rapidamente quando esposto all'aria ed è abbastanza morbido da essere tagliato con un coltello.

Il Cerio è il secondo elemento della serie dei lantanidi e, mentre spesso mostra lo stato di ossidazione (+3) caratteristico della serie, eccezionalmente si presenta anche con uno stato (+4), che non si ossida in acqua. È anche tradizionalmente considerato uno degli elementi delle terre rare. Non ha alcun ruolo biologico e non è eccessivamente tossico. Il Cerio e i suoi composti hanno una varietà di impieghi: ad esempio, l'Ossido di Cerio (CeO_2) viene utilizzato per lucidare il vetro ed è una parte importante dei convertitori catalitici.

Negli ultimi anni il CeO_2 ha suscitato grande interesse in ambito biologico per la sua capacità di proteggere le cellule dallo stress ossidativo, neutralizzando e riducendo i ROS accumulati all'interno delle cellule in differenti condizioni patologiche, quali cancro, Parkinson, diabete (123, 128), (Fig. 14).

Normalmente, il metabolismo cellulare produce i ROS, la cui presenza è fondamentale per la salute delle cellule, ma la loro concentrazione deve essere mantenuta in equilibrio. Concentrazioni eccessive, infatti, sono implicate nella patogenesi di numerose malattie correlate, come tumori, Parkinson, Alzheimer, disfunzioni cardiovascolari, condizioni infiammatorie, morbo di Chron, diabete e artrite reumatoide.

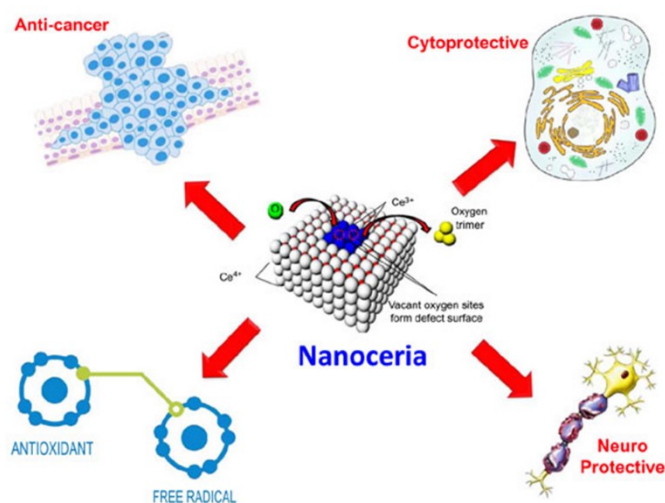


Fig. 14 Potenziale farmacologico delle Nanoparticelle di Ossido di Cerio in differenti patologie (fonte: Nataraja.J. 2017)

Recenti ricerche hanno dimostrato che le nanoparticelle di CeO_2 potrebbero mantenere nelle cellule la corretta concentrazione di specie reattive di ossigeno, eliminando l'eccesso delle specie ossidanti, che altera l'equilibrio fisiologico e provoca l'insorgenza delle malattie. Tale proprietà è dovuta alla presenza di “oxygen vacancies” sulla superficie delle particelle di CeO_2 , che consentono agli ioni di cerio di immagazzinare e rilasciare ossigeno in modo reversibile e quindi passare tra i due stati di ossidazione (82, 114), (**Fig. 15**). Quando i ROS interagiscono con la superficie del CeO_2 , gli ioni Ce^{3+} sono ossidati a ioni Ce^{4+} neutralizzando i radicali liberi dell'ossigeno. Successivamente gli ioni Ce^{4+} riducono ancora il loro stato di ossidazione a Ce^{3+} per reazione con gli ioni idrogeno (90, 259).

Poiché il processo antiossidante è strettamente correlato alla struttura superficiale dell'Ossido di Cerio, questo effetto diviene di estrema rilevanza quando tale molecola è usata in forma di particelle di dimensioni nanometriche, chiamate anche Nanoceria (67, 152, 185). Pertanto, quando la Nanoceria è usata in ambito biologico, come ad esempio nelle colture cellulari o in modelli animali, agisce come scavenger dei radicali dell'ossigeno, mimando il ruolo degli enzimi antiossidanti Superossido Dismutasi e Catalasi (**Fig. 15 c**).

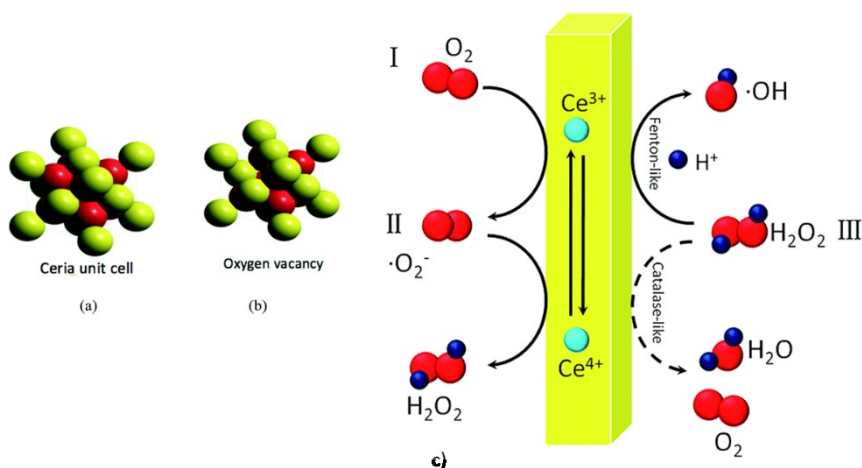


Fig. 15 Struttura e reazioni catalitiche della Nanoceria. a) Cella unitaria della Nanoceria e b) cella unitaria in cui manca un atomo di ossigeno in posizione sinistro-anteriore (fonte: Alastair Cormack 2014); c) Capacità antiossidante della Nanoceria (fonte: Pan Ni 2015)

A differenza degli antiossidanti esogeni organici, che sono limitati da instabilità chimica (185), la Nanoceria mostra il grande vantaggio di auto-rigenerarsi all'interno delle cellule (95). Infatti, lo switch degli stati ossidativi del Cerio consente il ripristino delle proprietà di rimozione dei radicali senza il dosaggio continuo del farmaco, come nel caso degli antiossidanti esogeni organici. Inoltre, i processi antiossidanti della Nanoceria forniscono un effetto protettivo non solo contro i ROS ma anche verso altre molecole reattive, quali gli RNS (209), portando alla contemporanea rimozione dei metaboliti dannosi per le cellule.

Le particelle di Nanoceria sono internalizzate dalle cellule: la loro presenza non disturba la vitalità nè modifica il tipo cellulare. Le cellule mantengono, infatti, le loro caratteristiche, ma acquisiscono la capacità di combattere lo stress ossidativo quando questo si manifesta. La protezione, inoltre, dura per almeno una settimana, un tempo molto lungo se paragonato agli antiossidanti canonici, probabilmente grazie all'effetto catalitico di rigenerazione delle proprietà della Nanoceria.

Questo risultato apre la prospettiva all'uso della Nanoceria come farmaco per la protezione dalle malattie dipendenti dallo stress ossidativo.

1.12 La Nanoceria nelle Malattie Neurodegenerative

Le Nanoparticelle di Ossido di Cerio (Nanoceria) sono recentemente emerse come potenziale terapeutico nel trattamento delle malattie neurodegenerative (MN) per le loro peculiari proprietà antiossidanti. Numerose evidenze sono state ricavate dal trattamento con Nanoceria di differenti modelli di malattie neurodegenerative, quali Malattia di Alzheimer, Morbo di Parkinson, Sclerosi Multipla e Sclerosi Laterale Amiotrofica (186).

L'interesse per l'impiego di nanoparticelle nelle MN dipende dalla loro capacità di alterare differenti pathways cellulari di segnale e anche dal loro ridotto diametro, che consente di attraversare facilmente la barriera emato-encefalica ed agire come scavengers dei ROS. Per tutte queste caratteristiche, esse potrebbero eventualmente rivoluzionare i trattamenti già esistenti per le MN (269).

La Nanoceria ha mostrato numerosi benefici in una grande varietà di modelli di malattie nelle quali lo stress ossidativo riveste un ruolo preminente. Ciò dipende dalla loro capacità di mimare la Superossido Dismutasi e la Catalasi, diversamente da molti altri agenti antiossidanti (Glutatione, Ascorbato, Vitamina E, ecc.), e dalla peculiare caratteristica di “non consumarsi” durante le reazioni di ossido-riduzione e, quindi, di autorigenerarsi (48, 249).

Inoltre, la Nanoceria possiede piccole dimensioni che le consentono un insolito accesso al SNC, dove ha una emivita tessutale piuttosto lunga. Studi sperimentali in modelli murini trattati con Nanoceria, non solo mostrano che queste nanoparticelle riescono ad attraversare la barriera emato-encefalica, ma anche che persistono nel cervello per settimane rimanendo biologicamente attive (68, 155).

In definitiva, considerato l'effetto protettivo osservato in modelli di malattie indotte da stress ossidativo, è possibile ipotizzare che la Nanoceria possa fornire simili benefici terapeutici anche in modelli cellulari di SLA e, quindi, si configuri come una nuova strategia terapeutica per i pazienti affetti da questa patologia.

CAPITOLO 2: Razionale dello studio e Obiettivi

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è ancora oggi considerata una patologia rara, nonostante sia la più frequente tra le malattie neurodegenerative dei motoneuroni.

Nonostante le numerose ricerche finora realizzate abbiano contribuito a migliorare le conoscenze sull'eziologia, la patogenesi, gli approcci diagnostici e terapeutici di questa patologia, non si è ancora giunti all'identificazione di un approccio diagnostico specifico, basato su tecniche non invasive, e che consenta di formulare una attendibile diagnosi precoce. Contemporaneamente, risulta di notevole importanza anche l'identificazione di nuove strategie terapeutiche più efficaci e che portino ad un maggiore beneficio per i pazienti affetti da SLA.

Alla luce di queste considerazioni, gli obiettivi principali del presente studio sono:

1) analizzare l'efficacia di una strategia terapeutica per la SLA basata sull'impiego delle Nanoparticelle di Ossido di Cerio (Nanoceria), sfruttandone le proprietà anti-ossidanti e la capacità di attraversare facilmente la barriera emato-encefalica, in virtù delle loro piccole dimensioni. In questo modo sarà possibile valutare le potenzialità di impiego terapeutico della Nanoceria nella SLA e/o il loro utilizzo quali adiuvante farmacologico del Riluzolo (farmaco attualmente impiegato nella terapia della SLA).

2) approfondire le conoscenze sugli effetti tossici delle proteine mal-ripiegate in modelli cellulari di SLA, con particolare attenzione alla formazione di aggregati proteici. In questo modo sarà possibile avere una visione più ampia dei meccanismi patogenetici della SLA ed identificare uno o più marcatori patologici, che possano contribuire alla formulazione di una diagnosi diretta e precoce.

In particolare, verrà utilizzato il modello cellulare motoneuronale murino (NSC-34), transfettato con il gene mutato $SOD1^{G93A}$ ed indotto a stress ossidativo mediante l'uso di perossido di idrogeno. L'effetto neuroprotettivo delle cellule pre-trattate con Nanoceria sarà valutato sulla vitalità cellulare, sul danno mitocondriale e sull'apoptosi cellulare. Tale approccio sarà esteso anche ai fibroblasti derivanti da biopsie cutanee di pazienti sardi affetti da SLA. Questo modello cellulare umano consentirà, da una parte, di traslare i risultati ottenuti nei modelli murini sull'uomo e, d'altra parte, di utilizzare una linea cellulare abbastanza semplice da prelevare con metodi poco invasivi e lesivi per il paziente.

Per lo studio sulla tossicità cellulare indotta da aggregati citoplasmatici di proteine mal-ripiegate, invece, verrà realizzato un modello cellulare di SLA 8, caratterizzato dalla mutazione P56S sul gene per la VAPB, in cui la presenza degli aggregati sarà valutata attraverso Immunofluorescenza indiretta. In questo caso, i risultati ottenuti nelle cellule murine saranno utilizzati come modello per lo studio sulle cellule nucleate del sangue periferico (PBMC) dei pazienti sardi con SLA. In queste cellule verranno valutate, mediante IFI, la frequenza delle alterazioni a carico di VAPB e la percentuale di casi di co-aggregazione di VAPB con SOD1 e TDP43, precedentemente riscontrata in modelli murini. La scelta di utilizzare i PBMC, oltre che per la semplicità e la non invasività del prelievo ematico, deriva dal fatto che costituiscono un valido modello rappresentativo della patologia, anche in considerazione del fatto che la maggior parte delle mutazioni finora note nei pazienti SLA sono di tipo somatico.

CAPITOLO 3: Materiali

3.1 Linee Cellulari

Cellule Staminali Neuronali murine (NSC-34)

NSC-34 (*Spinal Cord Neuronal Clone 34*), (88, 89) è una linea cellulare ibrida (neuroblastoma murino N18TG2 × motoneuroni embrionali di midollo spinale murino) che manifesta le caratteristiche motoneuronali, incluse le attività enzimatiche della colina-acetil-transferasi e della sintetasi, l'accumulo e il rilascio di acetilcolina, la presenza delle triplette di proteine che costituiscono i neurofilamenti e la capacità di proliferare attivamente in coltura, anche in assenza di specifici agenti inducenti (44).

Questa linea cellulare è stata ampiamente utilizzata come modello per lo studio dei meccanismi della neurodegenerazione motoneuronale associata a forme mutate della SOD1 umana.

La linea cellulare NSC-34 (**Fig. 16**) deriva dalla transfezione del plasmide pTet-ON (Clontech), che codifica per il trans-attivatore (rtTA) sotto il controllo reversibile della tetraciclina, attraverso il reagente Lipofectamina (Invitrogen) e secondo le linee guida del produttore (97). Dopo 3 settimane di selezione con Geneticina G418 400µg/ml (Gibco), singoli cloni sono stati isolati e selezionati in base alla loro capacità di controllare l'espressione di un gene inducibile (pTRE-luc, Clontech). La linea cellulare così ottenuta, denominata NSC-34-ON7, mostra un livello molto basso di espressione basale e un'elevata inducibilità. Da questa, mediante il plasmide pTRE2 o pTRE2-5myc, sono state realizzate le linee cellulari inducibili esprimenti il cDNA che codifica per la SOD1 umana, nella forma wild-type (Wt) o in una delle sue 12 mutazioni tipiche della fSLA. Contemporaneamente è stato co-transfettato il plasmide pTK-Hygro (Clontech) per consentire la selezione dei cloni esprimenti il costrutto genico e resistenti all'esposizione con Igromicina B 400µg/ml (Invitrogen). Successivamente, i cloni sono stati analizzati mediante Western blot e sono stati selezionati quelli con livelli di espressione simili. Tali cloni esprimono alti livelli del gene umano SOD1, in presenza di Doxiciclina, derivato sintetico della Tc, per 48 ore a 37°C. Sia la SOD1 endogena murina e sia l'isoforma umana sono state identificate e hanno mostrato un differente peso molecolare, rispettivamente di 19kDa e 23kDa. Il protocollo di trattamento con la Doxiciclina è stato selezionato in modo da ottenere l'induzione a

bassi livelli di hSOD1, paragonabile tra le NSC WT e le 93, condizione sotto la quale nelle cellule mutanti G93A è solo lievemente tossica per le cellule stesse (11).

Le colture così ottenute contengono due popolazioni cellulari: cellule di piccole dimensioni, non differenziate, con la capacità di divisione cellulare e cellule di grandi dimensioni e multinucleate.

Queste cellule “motor neuron-like” immortalizzate rappresentano un buon modello per lo studio della neurotossicità, dei meccanismi fisiopatologici della SLA e della degenerazione dei MNs associata alla forma mutata della SOD1 umana.

Nel presente lavoro, le linee cellulari NSC ON, WT e 93, sono state fornite dal Laboratorio di Biologia Molecolare (Responsabile Prof.ssa Crosio) del Dipartimento di Scienze Biomediche dell’Università di Sassari.

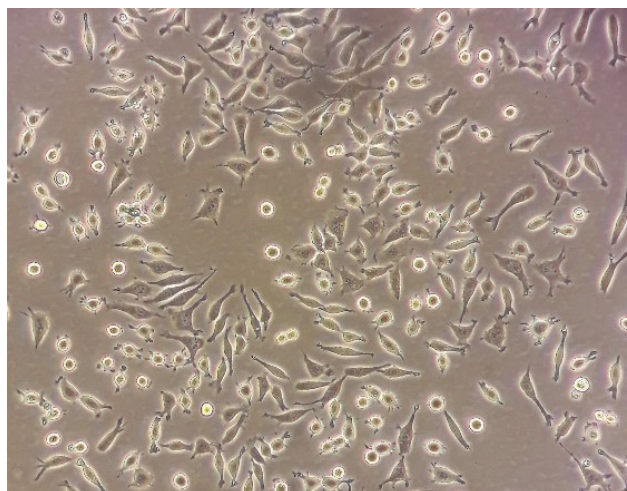


Fig. 16 Particolare di cellule NSC-34 in coltura a 37°C con 5% CO₂. Le cellule sono tenute in coltura in DMEM F-12 addizionato di Penicillina, Streptomicina e TET 10%.

Fibroblasti murini (L929)

I fibroblasti murini L929 rappresentano il clone 929 del ceppo di origine “L”, ottenuto dal tessuto areolare ed adiposo sottocutaneo del ceppo murino C3H/An di sesso maschile e di 100 giorni di vita (WR Earle in 1940), (**Fig. 17**).

Il ceppo “L” (tessuto connettivo) rappresenta una delle prime linee cellulari ad essere mantenute stabilmente in coltura (1948) e il clone 929 è il primo ad essere stato sviluppato. Esso è stato identificato mediante tecnica capillare per isolamento di singole cellule dalla 95° coltura cellulare a partire dal ceppo “L” di origine.

Le L929 sono cellule che crescono in adesione, generalmente utilizzate per lo studio della tossicità cellulare e sono anche un utile modello cellulare per le trasfezioni.

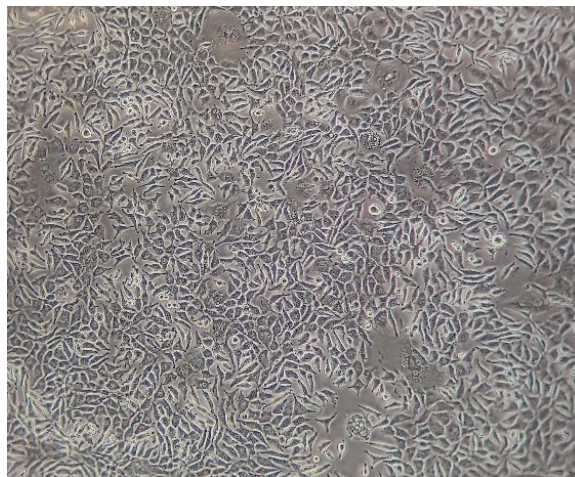


Fig. 17 Fibroblasti murini L929 in coltura a 37°C e 5% CO₂

Fibroblasti umani

Queste linee cellulari sono state fornite dalla Banca di Cellule di pazienti SLA, creata nell'ambito del "Progetto Eugenio" da un gruppo di ricercatori del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università di Cagliari, coordinato dal Dr. Sandro Orrù.

Sono cellule prelevate direttamente da una piccola biopsia (larghezza inferiore ad 1 mm e lunghezza di circa 1 o 2mm) dell'avambraccio di pazienti sardi affetti da SLA e di soggetti sani, utilizzati come gruppo controllo. Messe in coltura, sono capaci di sviluppare, crescere e riprodursi autonomamente al di fuori dell'organismo che le ha generate (Fig. 18).

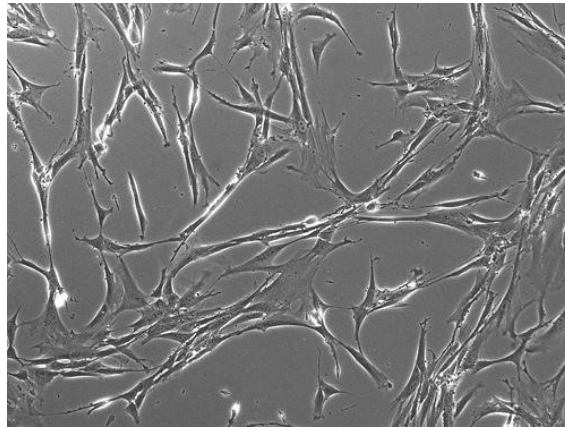


Fig. 18 Fibroblasti umani isolati da biopsie cutanee di pazienti SLA e soggetti sani

Ciascuna cellula contiene esattamente gli stessi geni dell'individuo di origine e, in condizioni particolari, può essere indotta a produrre le stesse molecole che produce negli organi e tessuti differenziati che si sono ammalati. Pertanto, costituiscono un modello formidabile per lo studio delle cause della malattia e, contemporaneamente, offrono la possibilità di sperimentare in modo semplice e rapido nuove terapie. Inoltre, per produrre le colture "in vitro" occorrono inizialmente pochissime cellule, che possono essere ricavate dallo strato germinativo dell'epidermide. Una volta allestita la coltura, dopo pochi giorni, alcune cellule cominceranno a riprodursi e nell'arco di 2 settimane raggiungeranno il numero di diversi milioni.

Cellule HeLa

Derivano da carcinoma cervicale di una donna di 31 anni. È la prima linea aneuploide derivata da tessuto umano e mantenuta stabilmente in coltura. È suscettibile al Poliovirus tipo I e Adenovirus Tipo 3.

Nel presente lavoro, le cellule HeLa sono state utilizzate come modello per la transfezione, con il metodo della Lipofectamina, del cDNA codificante per il gene della VAPB, sia nella forma wild type che con la mutazione P56S, la più frequente nei casi di SLA (Fig. 19).

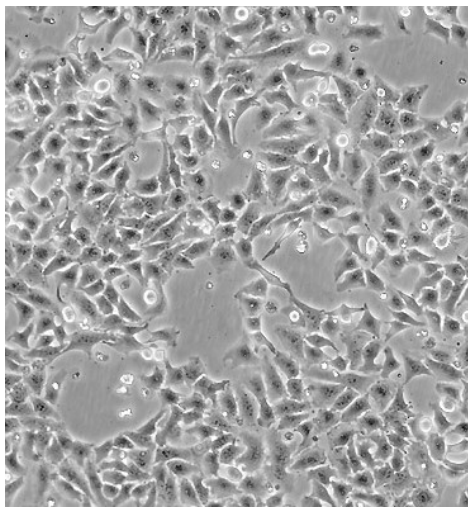


Fig. 19 Particolare di cellule HeLa in coltura

Cellule Polimorfonucleate umane (PBMC)

Sono le cellule della frazione mononucleata del sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC), caratterizzate da un grande nucleo circolare e consistono in linfociti T, B, cellule Natural Killer e monociti. Gli eritrociti e le piastrine differiscono da esse per la mancanza di un nucleo, mentre i granulociti (neutrofilo, basofilo ed eosinofilo) differiscono per la presenza di nuclei multi-lobati.

3.2 Attivazione trascrizionale controllata da Tetraciclina (Tet-ON)

È un sistema di espressione genica inducibile, nel quale la trascrizione è attivata o disattivata in modo reversibile in presenza dell'antibiotico Tetraciclina, o di uno dei suoi derivati (ad esempio Doxyciclina). In condizioni fisiologiche, il promotore p-Tet esprime il repressore tetR e l'attivatore tetA, una proteina in grado di pompare all'esterno della cellula l'antibiotico tetraciclina (211). A seconda che l'attivazione trascrizionale del gene di interesse sia indotta o repressa dalla presenza di tetraciclina, il sistema viene distinto in Tet-On o Tet-Off.

Tale sistema si basa sugli elementi regolativi dell'operone di resistenza alla tetraciclina del trasposone Tn10 di *E. coli*. In questo sistema, infatti, la presenza di tetraciclina blocca il legame del repressore tetR (*Tetracycline Repressor*, repressore sensibile alla tetraciclina) alla sequenza dell'operatore tetraciclina, tetO (*Tetracycline Operator*, operatore sensibile alla tetraciclina), posta a monte del gene e che codifica per la resistenza all'antibiotico.

In altre parole, la presenza della tetraciclina attenua la repressione trascrizionale.

Più nello specifico, nel sistema d'espressione eucariotico Tet-ON, un transattivatore chimerico rtTA (**R**everse **T**etracycline-controlled **T**ransactivator protein, transattivatore sensibile alla tetraciclina), creato dalla fusione di tetR con il dominio di transattivazione della proteina VP16 del virus Herpes simplex, regola l'espressione di geni posti sotto il controllo dell'elemento del promotore sensibile alla tetraciclina TRE (*Tetracycline-Responsive promoter Element*). Il TRE è stato ottenuto fondendo il promotore minimo del citomegalovirus (CMVmin) con sette concatenameri della sequenza operatore tetO. L'rtTA presenta quattro sostituzioni amminoacidiche nel dominio di legame al DNA di tetR che ne alterano le proprietà di legame: rtTA può, infatti, interagire con TRE solo in presenza dell'antibiotico Doxyciclina.

In tal modo, nel sistema Tet-ON la trascrizione del gene regolato dal TRE viene stimolata da rtTA, solo in presenza di Doxyciclina.

Risulta quindi evidente che l'utilizzo del sistema Tet richiede l'utilizzo di due plasmidi: uno codificante per il transattivatore, l'altro per il gene/i d'interesse sotto il controllo del promotore TRE (Fig. 20).

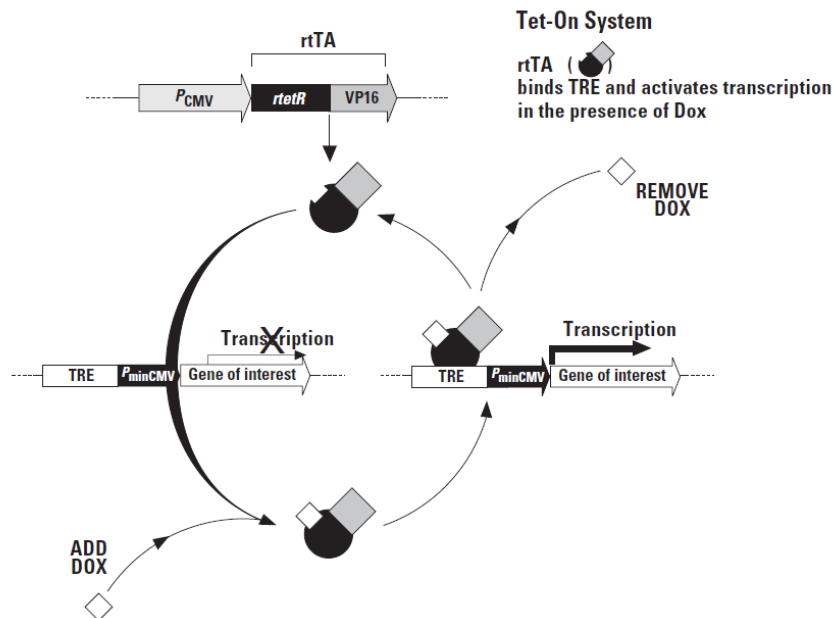


Fig. 20 Regolazione genica nel sistema Tet-On (fonte User Manual - Clontech 2012)

Le cellule NSC-34 utilizzate nel presente lavoro derivano dalla transfezione stabile della linea cellulare NSC-34 con il plasmide pTet-ON codificante per il sistema d'espressione eucariotico sensibile alla tetraciclina.

3.3 Vettori plasmidici

Per clonare e/o esprimere i differenti cDNA umani nelle linee cellulari murine “*in vitro*” sono stati utilizzati seguenti vettori plasmidici:

Vettore per NSC-34 (*pCMV-hSOD1^{WT/G93A}*): le sequenze geniche codificanti per la SOD1^{WT} e la SOD1^{G93A} sono isolate mediante RT-PCR dai tessuti di topi transgenici e clonate nei siti di restrizione Hind III e Xba I del vettore pRc/CMV (Invitrogen) (284, 109).

Vettore per HeLa (*pCDNA3.1/myc-His C*): la sequenza del cDNA di VAPB è stata amplificata mediante specifici primers oligonucleotidi senso (VAPB-F 5'-CTAAGGAACATGGCGAAGGT-3) e antisenso (VAPB-R 5'-TGGATCCACCAATCCAATTT-3) da linfociti del sangue periferico umano di soggetti sani. Il prodotto di PCR risultante è stato clonato nel vettore pCR8/GW/TOPO TA (kit Invitrogen) e sequenziato. Per valutare l'espressione di VAPB e le sue varianti nelle cellule di mammifero, i cDNA sono sub-clonati nel vettore di espressione pCDNA3.1/myc-HIS C (Invitrogen). In questa fase è stato utilizzato un primer senso codificante per un tag della Emoagglutinina (HA-tag), formando un prodotto con l'estremità N-terminale marcata dal HA-tag. La mutazione puntiforme P56S è stata introdotta nell'intera sequenza di DNA per VAPB e nelle varianti attraverso mutagenesi sito specifica nell'esone 2 (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene).

3.4 Popolazione di studio: pazienti e controlli

I pazienti sardi affetti da SLA, i pazienti affetti da altre patologie neurodegenerative (Parkinson) e i soggetti sani sono stati reclutati dai Reparti di Pneumologia e Clinica Neurologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) di Sassari. Nei primi, la diagnosi di SLA è stata formulata secondo i criteri di score ASFRP (Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale) e considerando la diagnosi differenziale con altre patologie neurologiche. I pazienti Parkinson sono stati diagnosticati secondo gli stadi Hoehn e Yahr.

I soggetti sani, senza segni clinici di malattie neurodegenerative, sono stati considerati come gruppo di controllo e reclutati anch'essi dai Reparti di Pneumologia e Neurologia della AOU di Sassari.

A ciascun soggetto è stato fornito un questionario anamnestico e il consenso informato per la partecipazione al presente studio. Per tutti i soggetti coinvolti è stato garantito il massimo livello di anonimato e, più in generale, le informazioni e dati personali sono stati usati secondo i criteri previsti dalla normativa sulla privacy.

Da ciascun soggetto sono stati prelevati un campione di sangue periferico (circa 20ml) ed una piccola biopsia cutanea (circa 1-2mm). Fibroblasti e PBMC sono stati isolati dai rispettivi campioni prelevati e conservati in azoto liquido fino alle analisi successive.

3.5 Nanoparticelle di Ossido di Cerio (Nanoceria)

Per il trattamento antiossidante delle cellule in coltura è stata usata una dispersione acquosa di Ossido di Cerio 56mg/ml (home-made), composta da nanoparticelle di diametro inferiore a 5nm (Fig. 21).

Questo materiale è altamente monodisperso in dimensioni e forma (indice di polidispersità <0.25) e possiede una reattività di superficie significativamente elevata. Quando utilizzato a valori di pH raccomandati, è stabile a densità di sospensione elevate.

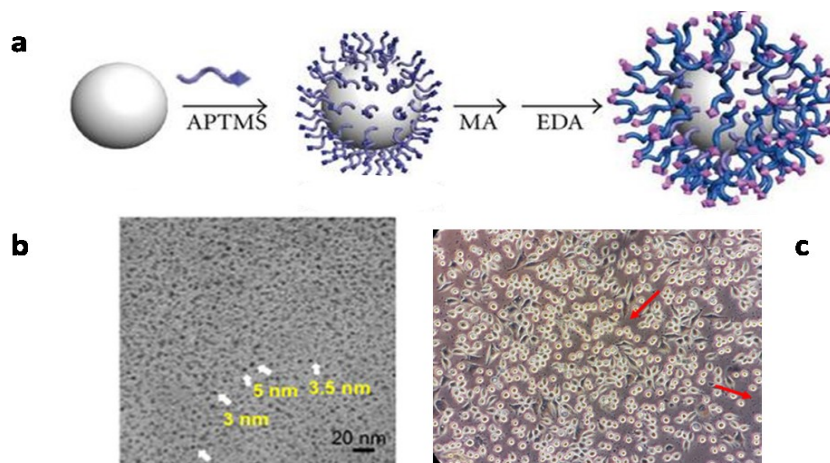


Fig. 21 Immagine schematica (a) e dopo analisi al TEM (b) delle nanoparticelle di Ossido di Cerio. (c) Nanoparticelle nell'ambiente extracellulare in colture di fibroblasti murini

Può essere utilizzato per svariate applicazioni che comprendono la catalisi delle emissioni, la lucidatura di superfici ottiche, l'uso come substrato per i metalli preziosi utilizzati in catalisi di ossidazione, la catalisi dell'acqua per la produzione di idrogeno e come scavenger dei radicali dell'ossigeno nei sistemi biologici.

Per il trattamento delle cellule in linea, sono state preparate, a partire dalla soluzione stock (20% wt in H₂O), differenti diluizioni con concentrazioni d'uso di 10-20-30-40-50µg/ml, da aggiungere direttamente nei pozzetti contenenti le cellule.

3.6 Anticorpi Primari e Secondari

Gli anticorpi primari e secondari sono stati utilizzati sia per le analisi di Western blot ed Immunofluorescenza, sia per la Citometria a Flusso.

Nel primo caso, tutti gli anticorpi sono stati preparati in PBS-Tween 0.05% addizionato di Latte al 3%: i primari sono stati incubati per 24 ore a 4°C, mentre i secondari sono stati utilizzati per un'ora e mezza a temperatura ambiente (RT).

Nell'immunofluorescenza, invece, gli anticorpi sono stati diluiti in PBS-BSA 1% e incubati alle stesse condizioni del Western blot.

La **Tab. 4** riporta l'elenco degli anticorpi primari e secondari utilizzati nel presente lavoro, specificando la specie di produzione e le concentrazioni d'uso. Questi anticorpi sono stati utilizzati per l'analisi dell'attivazione dei pathways apoptotici e dei principali marcatori dello stress ossidativo, valutata mediante Western blot e Immunofluorescenza.

	Anticorpo	Ditta	Specie	Diluizione WB	Diluizione IHC
Primario	Polyclonal anti-Cu/Zn SOD1	Enzo Life Science	Rabbit	1:1000	-
	anti-VAPB	Abcam	Rabbit	1:1000	1:500
	anti- α tubulina	Sigma Aldrich	Rabbit	1:1000	-
	anti- β actina	Sigma Aldrich	Mouse	1:5000	-
	Polyclonal anti-ubiquitina	Dako	Rabbit	1:1000	1:500
	anti-LC3	MBL	Rabbit	1:2000	-
	anti-p62	MBL	Rabbit	1:1000	1:500
	anti-GRP78	Cell Signalling	Mouse	1:1000	-
	mAb anti-Caspase 3	Cell Signalling	Rabbit	1:1000	-
	mAb anti-Caspase 9	Cell Signalling	Mouse	1:1000	-
	anti-HSP27	Santa Cruz Biotechnology	Goat	1:500	-
	anti-HSP90	Abcam	Rabbit	1:500	-
Secondario	anti-mouse HRP coniugato	Sigma Aldrich	Rabbit	1:5000	1:5000
	anti-rabbit HRP coniugato	Proteintech	Goat	1:5000	1:5000

Per le analisi di citofluorimetria, invece, sono stati utilizzati alcuni marcatori per i principali cluster di differenziazione (CD), tra cui APC Cy-7-CD8, PE-CD21, PE-CD20, PerCP-CD14, APC-CD3, gli anticorpi secondari Goat anti-rabbit IgG (whole molecule) - FITC (Sigma Aldrich) e, infine, i marcatori dell'apoptosi cellulare, tra cui PE-Annexin V (BD Pharmingen) e PerCP7-AAD (BD Pharmingen).

3.7 Marcatori per l'apoptosi cellulare

PE-Annexin V (*BD Pharmingen™*)

Il programma apoptotico è definito da specifiche caratteristiche morfologiche, inclusi la perdita di asimmetria ed integrità della membrana plasmatica, la condensazione del citoplasma e del nucleo e il taglio enzimatico inter-nucleosomiale del DNA (www.biosciences.com). Il danno alla membrana plasmatica è uno dei primi segnali di attivazione dell'apoptosi. Infatti, nelle cellule apoptotiche, il fosfolipide di membrana fosfatidilserina (PS) è traslocato dal lato interno a quello esterno della membrana plasmatica e risulta esposto all'ambiente extracellulare.

L'Annexina è un marcatore specifico per l'identificazione delle cellule apoptotiche, in quanto si lega alla superficie fosfolipidica carica negativamente della membrana plasmatica, attraverso elevata affinità per la fosfatidilserina (PS). Tale legame è Calcio dipendente e specifiche concentrazioni di Calcio e sali sono richieste per una marcatura ottimale, come descritto nel protocollo per la marcatura con PE-Annexin V.

L'Annexina può essere coniugata a differenti fluorocromi, tra cui la Ficoeritrina (PE). Tale legame non altera l'affinità per la PS e così risulta essere una sonda sensibile, utile per l'analisi citometrica di cellule che sono in fase di apoptosi.

Poiché l'esternalizzazione della PS si verifica nelle prime fasi dell'apoptosi, la colorazione con Annexina V può identificare le cellule in apoptosi ad uno stadio precoce, rispetto alle metodiche basate sui cambiamenti nucleari, quali la frammentazione del DNA, che si verificano durante l'apoptosi (**Fig. 22**).

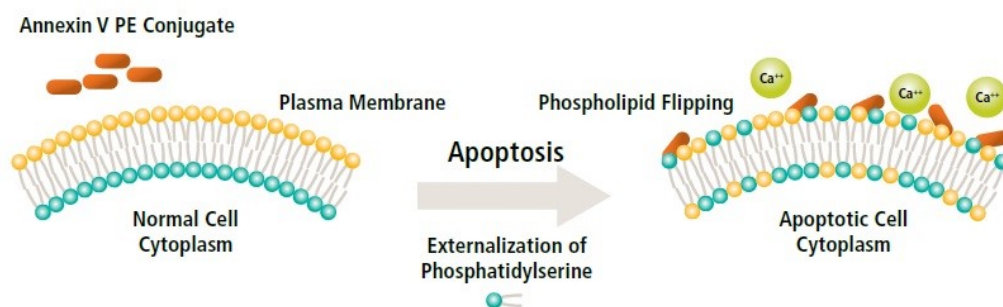


Fig. 22 Meccanismo dell'Annexina V sulla fosfatidilserina nelle cellule apoptotiche

La marcatura con PE-Annexin V è tipicamente usata in coniugazione a coloranti della vitalità cellulare, quali il 7-Amino-Actinomicina (7-AAD), in modo da consentire l'individuazione di cellule nelle fasi precoci dell'apoptosi (7-AAD-/PE-Annexin+), (**Fig. 23**).

Le cellule vitali che presentano una membrana integra e compatta, non sono marcate con 7-AAD, mentre le membrane di cellule danneggiate e morte sono permeabili al 7-AAD. Per esempio, le cellule considerate vitali sono PE-Annexin V e 7-AAD negative; le cellule in fase precoce di apoptosi o già morte sono entrambe PE-Annexin e 7-AAD positive.

Tuttavia, questa metodica non consente di distinguere tra cellule che hanno subito la morte per apoptosi rispetto a quelle morte in seguito a necrosi, perché in entrambi i casi le cellule risultano marcate con PE-Annexin V e 7-AAD.

Nonostante ciò, quando l'apoptosi è misurata nel tempo, le cellule possono essere tracciate nei differenti stadi: le vitali o in apoptosi non ancora evidente risultano negative per PE-Annexin V e 7-AAD; quelle negli stadi precoci dell'apoptosi, con membrana ancora integra, sono PE-Annexin V positive e 7-AAD negative; infine, quelle negli stadi finali dell'apoptosi e morte sono positive ad entrambi i marcatori. L'evoluzione delle cellule in questi tre stadi suggerisce l'avvenuta apoptosi. Al contrario, osservazioni singole forniscono minori informazioni circa il processo apoptotico in corso, anche se le cellule risultano positive per entrambi i marcatori.

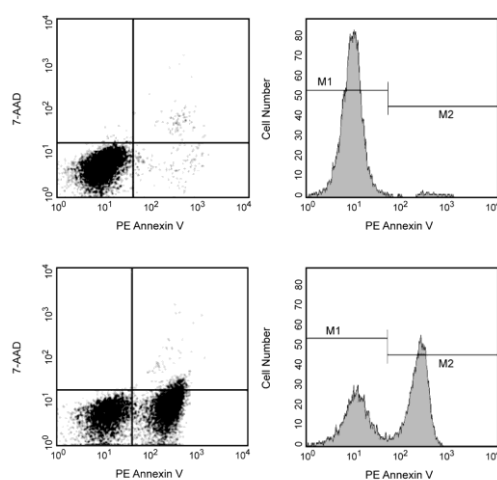


Fig. 23 Marcatura con PE-Annexina e 7-AAD durante l'analisi citofluorimetrica

PerCP-7-AAD (BD Pharmingen™)

Il 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) è un marcatore degli acidi nucleici che può essere usato in alternativa allo ioduro di propidio (PI) per l'esclusione di cellule non vitali durante l'analisi citofluorimetrica (www.biosciences.com), (Fig. 24). Il vantaggio del 7-AAD rispetto al PI è la capacità di essere utilizzato insieme ad anticorpi monoclonali e coniugati alla ficoeritrina (PE) e alla fluoresceina isotiocianato (FITC) in un'analisi a 2 colori, con una minima sovrapposizione di spettro tra le fluorescenze di emissione di 7-AAD, PE e FITC. La fluorescenza 7-AAD è rilevata alla lunghezza d'onda di 650nm dello spettro.

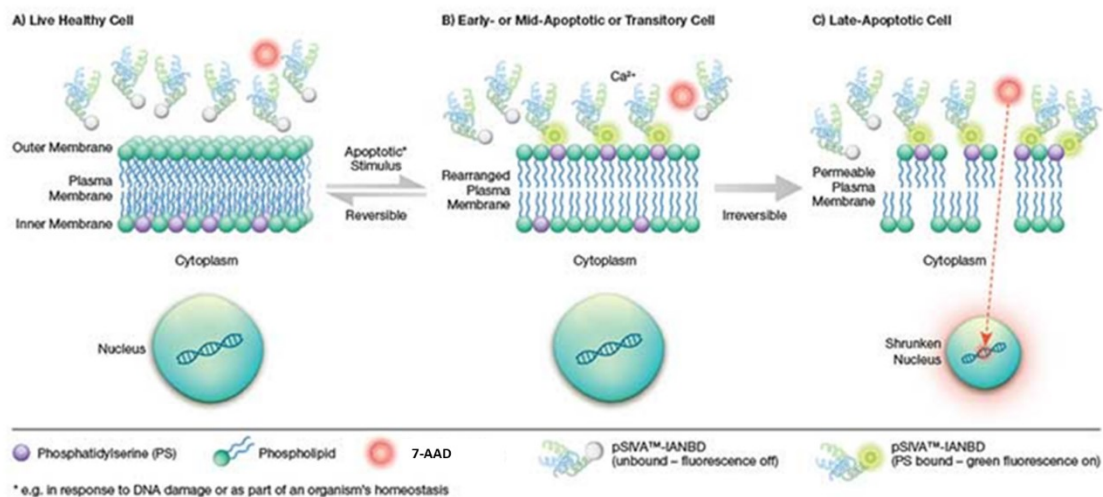


Fig. 24 Caratteristiche della membrana cellulare in condizioni fisiologiche e negli stadi di apoptosi. Il colorante fluorescente 7-AAD riesce ad entrare nelle cellule durante lo stadio tardivo dell'apoptosi, dove si lega al DNA

3.8 Citometria a flusso

La citometria a flusso (CF) è una tecnica di misura delle proprietà delle cellule che, negli ultimi anni, ha raggiunto una notevole diffusione, sia nei laboratori clinici che in quelli di ricerca.

Differenti fattori hanno contribuito a questo notevole sviluppo e sono rappresentati da:

- possibilità di utilizzare più laser di emissione, in modo da effettuare analisi multiparametriche a quattro e più colori;
- disponibilità di anticorpi monoclonali con un'ampia gamma di fluorocromi e diretti contro un'ampia varietà di antigeni di membrana e/o intracellulari;
- riduzione dei tempi di esecuzione delle analisi e della complessità nell'utilizzo dello strumento.

Ad oggi esistono numerosi i campi di applicazione della CF, tra cui:

- lo studio della ploidia e della proliferazione cellulare;
- l'analisi del ciclo cellulare;
- l'analisi immunofenotipica multiparametrica;
- la risposta del sistema immunitario alla somministrazione di vaccini (cellule antigene-specifiche, produzione di citochine, ecc);
- i livelli di apoptosi in differenti patologie.

Le origini della CF sono strettamente connesse con la microscopia ottica. In effetti, un citometro a flusso non è altro che un microscopio dotato di un sistema automatico di trasporto delle cellule e di un dispositivo di misura della luce che sostituisce l'occhio dell'osservatore. Quest'ultimo aspetto, peraltro, qualifica in modo specifico la caratteristica principale della CF, cioè il fatto che si tratta di una tecnica di misura e non una tecnica di sola osservazione. Da qui emerge anche il principale limite della CF, ossia la sua incapacità di descrivere i dettagli della forma e della struttura della cellula, salvo casi particolari in cui valutazioni di questo tipo possono essere ottenute in via indiretta per specifiche caratteristiche fisiche della cellula o con l'uso di tecniche di colorazione capaci di discriminare specifici compartimenti cellulari.

Le tecniche di colorazione, o di reazione con sostanze fluorescenti, rappresentano per la CF l'analogo delle tecniche, prevalentemente in assorbimento, caratteristiche della microscopia ottica.

Le tecniche in fluorescenza garantiscono elevata sensibilità di misura, per cui è possibile valutare in maniera quantitativa la presenza di sostanze fino a poche centinaia di molecole per cellula. Il maggior inconveniente delle misure in fluorescenza, ovvero l'attenuazione del segnale in seguito ad eccitazione (fotobleaching), è del tutto trascurabile in CF, dal momento che i tempi di eccitazione sono limitati a durate dell'ordine di millisecondi, laddove i tempi di fotobleaching possono essere di secondi, minuti e maggiori (169).

I principali vantaggi offerti dalla CF sono la possibilità di analisi multiparametriche, l'elevato numero di cellule esaminate, la rapidità dei tempi di analisi (oltre 1000 cellule/sec), l'obiettività, la riproducibilità e l'affidabilità statistica delle letture, e la capacità di processare i campioni, conservandone la vitalità cellulare.

Accanto a tutti questi aspetti vantaggiosi della CF, esistono anche alcune importanti limitazioni della metodica, rappresentati dall'incapacità di analisi di cellule molto rare che, a causa del loro ridotto numero in confronto agli eventi analizzati, potrebbero essere difficilmente separabili dal "rumore di fondo", dalla necessità di dover lavorare con campioni in fase monodispersa, dall'impossibilità di localizzare la sede di provenienza del segnale in caso di contemporanea presenza di marcatori nei diversi compartimenti cellulari e dai costi eccessivi dei vari marcatori.

La CF consiste in una metodica qualitativa e quantitativa che consente una rapida analisi di un elevato numero di cellule in breve tempo (50.000 cellule in pochi secondi), quantificando numerosi parametri per ogni singola cellula. Misura, inoltre, le caratteristiche ottiche e fluorescenti di singole cellule o di altre particelle, inclusi nuclei, microrganismi, preparazioni di cromosomi e biglie in lattice e permette anche di determinare il contenuto di DNA e RNA, identificare i diversi sottotipi cellulari, gli organelli intracellulari e l'attività di alcuni enzimi.

I marcatori fluorescenti possono legare o intercalare con differenti componenti cellulari ed è possibile utilizzare anticorpi coniugati a coloranti fluorescenti in grado di legare specifiche proteine sulle membrane cellulari e all'interno delle cellule. Quando le cellule marcate passano attraverso una sorgente luminosa, le molecole fluorescenti sono eccitate ad uno stato energetico maggiore. Ritornando poi al loro stato energetico iniziale, i fluorocromi emettono un'energia con una lunghezza d'onda maggiore.

Il principio di base della citometria a flusso (**Fig. 25**) prevede che una sospensione cellulare monodispersa (es. cellule del sangue periferico, aspirato midollare, ecc) venga iniettata in un sistema fluidico il quale, in opportune condizioni idrodinamiche, tende a trasportare le cellule in maniera separata ed ordinata fino al punto di misura, dove incontra il fascio di luce focalizzata proveniente dal laser. L'incontro tra il raggio di luce ed ogni singola cellula presente nel flusso cellulare genera dei segnali. Questi sono legati alle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici ed inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. I segnali elettrici provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore di dati, che provvede alla loro visualizzazione su monitor, rappresentazione grafica e definizione statistica.

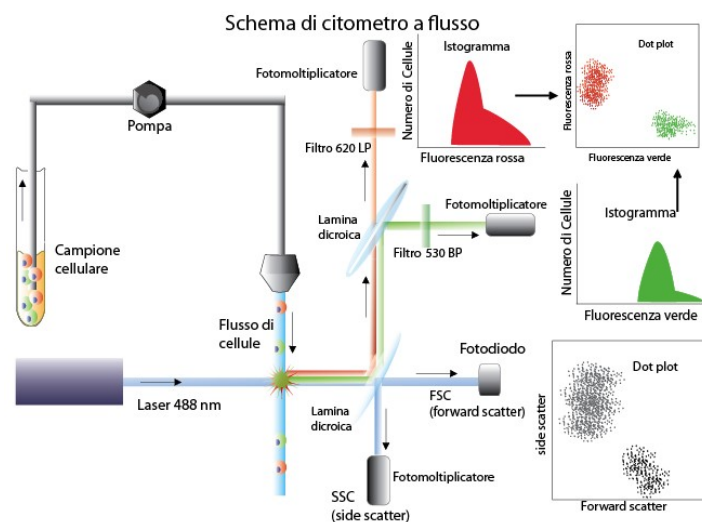


Fig. 25 Principio di funzionamento di un citometro a flusso nelle differenti fasi

Il principio di funzionamento di un citometro a flusso prevede differenti fasi, qui sotto elencate:

- 1) le cellule di una popolazione eterogenea sono aspirate dalla provetta ed immesse in una camera di flusso, dove sono separate le une dalle altre;
- 2) ogni singola cellula viene poi attraversata da un fascio di luce, che eccita i fluorocromi e determina l'emissione di un segnale fluorescente;

- 3) il segnale, passando attraverso un sistema di filtri e specchi, raggiunge un rivelatore;
- 4) il segnale viene processato elettronicamente, trasformato da analogico a digitale ed inviato all'analizzatore, che elabora il dato e lo visualizza tramite un grafico;
- 5) attraverso piastre di deflessione le cellule analizzate possono essere raccolte separatamente tramite un processo definito "sorting".

CAPITOLO 4: Metodi

4.1 Colture Cellulari “*in vitro*”

Le Cellule NSC-34 non transfettate (NSC ON) e le linee monoclonali che esprimono stabilmente la SOD1^{WT} (NSC WT) e la SOD1^{G93A} (NSC 93) sono state messe coltura in DMEM/F12 ad alto glucosio (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco BRL), in presenza del 10% di siero fetale bovino, privato di tetraciclina (TET-free FCS, Clontech) e precedentemente inattivato a 56°C per 30 minuti. Il terreno è addizionato anche degli antibiotici Penicillina G 100 unità/ml e Streptomicina 100µg/ml (Gibco BRL).

Tutte le linee cellulari NSC ON, WT e 93 sono state mantenute in selezione mediante l'aggiunta di Geneticina G418 400µg/ml (Gibco). Alle linee NSC WT e 93 è, inoltre, aggiunta l'Igromicina B 200µg/ml (Invitrogen), indispensabile per l'induzione dell'espressione del gene umano per la SOD1.

Le linee cellulari sono state mantenute in coltura contemporaneamente per un massimo di 20 passaggi, e mai al di sopra, in modo da limitare qualsiasi effetto potenziale di senescenza.

I Fibroblasti Murini ed Umani sono stati messi in coltura in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) ad alto contenuto di glucosio, addizionato del 10% di siero fetale bovino (FBS) e del 1% di Penicillina/Streptomicina (Penicillina 10000 unità e Streptomicina 10mg/ml in NaCl 0.9%, Sigma Aldrich).

Le Cellule HeLa sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL), in presenza del 10% di FBS e del 1% di Penicillina/Streptomicina. Questa linea cellulare è stata transfettata una volta raggiunta la confluenza del 50-60%.

Tutte le colture cellulari sono state lasciate in crescita a 37°C e in atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂. Quando le cellule hanno raggiunto una confluenza del 70-80%, sono state staccate usando Tripsina (0.5g/ml, 68mM EDTA, Gibco) e successivamente diluite in terreno di coltura fresco.

4.2 Isolamento dei PBMC dal sangue periferico

Le cellule della frazione mononucleata del sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità Ficoll-Histopaque® (Sigma-Aldrich), un polisaccaride idrofilico utilizzato per separare le componenti del sangue in differenti strati.

Il sangue intero in Eparina (20ml), prelevato dai pazienti SLA, dai pazienti Parkinson e dai controlli sani, è stato miscelato con un uguale volume di Ficoll-Histopaque a RT per ottenere la stratificazione dei suoi componenti.

Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 20 minuti a 25°C, è stato isolato l'anello dei PBMC, lavato in PBS e nuovamente centrifugato a 1200 rpm per 10 minuti.

Per rimuovere completamente i globuli rossi ed avere quindi un pellet chiaro di PBMC, si è incubato il pellet in ACT pH 7.2 (NH₄Cl 0.83%, Tris-Base 2.06% pH 7) per 10 minuti a RT. Successivamente, l'ACT è stato rimosso mediante 2 lavaggi con PBS e il pellet ottenuto è stato risospeso in PBS 1X per la conta nella camera di Burker.

4.3 Transfezione delle cellule eucariotiche con il metodo della Lipofectamina

La transfezione è una tecnica che permette l'ingresso di DNA in cellule eucariotiche così da poter studiare l'espressione di geni di interesse.

Per ottenere l'espressione transitoria dei vettori plasmidici, le cellule NSC-34 e HeLa sono state transfettate attraverso il metodo della Lipofectamina (LipofectAMINE LTX e PLUS reagent - Life Technologies), secondo il protocollo suggerito dal produttore.

In particolare, 1.5µg (equivalenti a 5-7×10⁵ cellule) del costrutto plasmidico, contenente il gene target, sono stati diluiti in Opti-MEM (Gibco BRL) e, successivamente, è stata aggiunta una quantità ottimale di Reagente PLUS™. La soluzione è stata incubata per 5 minuti a RT. Quindi la Lipofectamina è stata dapprima diluita in Opti-MEM e poi aggiunta al DNA precedentemente diluito. La soluzione è stata incubata per 30 minuti a RT.

I complessi DNA-lipidi così formati, sono stabili per 6 ore a temperatura ambiente. A questo punto, le cellule sono state incubate con la miscela (Lipofectamina, plasmide-DNA e terreno di coltura) a 37°C per 4 ore. I cloni positivi alla transfezione sono stati selezionati e messi in coltura a 37°C fino al loro utilizzo.

4.4 Estrazione delle proteine citoplasmatiche

Una volta raggiunta una confluenza del 70%, tutte le cellule NSC-34, HeLa, L929 e i fibroblasti umani sono state lavate due volte con PBS (pH 7.4, -CaCl₂, -MgCl₂, Gibco), tripsinizzate con Tripsina (0.5g/ml, 68mM EDTA, Gibco) e centrifugate a 6000 rpm per 5 minuti a 4°C. I pellet ottenuti sono stati lisati in uno specifico Buffer di Lisi (NaCl 150mM, Triton X-100 1%, Tris HCl 50mM pH 8), addizionato di Inibitori di Proteasi (Roche complete, Mini; Protease Inhibitor Cocktail Tablets 7x) per 30 minuti in ghiaccio. Per ottenere una lisi completa, i pellet sono stati sonicati per 15 minuti e, dopo centrifugazione a 6000 rpm per 10 minuti a 4°C, il surnatante contenente l'estratto proteico è stato incubato per 5 minuti in ghiaccio con SDS 1% e conservato per le successive analisi.

4.5 Quantificazione delle proteine con il metodo Bradford

Per valutare la concentrazione delle proteine in soluzione nel surnatante, prima della separazione su gel di poliacrilammide, è stato utilizzato il reagente Bradford (Sigma Aldrich), che consiste in una soluzione del colorante Comassie Brilliant Blue G-250 in acido fosforico e metanolo. La quantificazione con tale reagente si basa su un sistema colorimetrico, ossia sulla formazione di un complesso tra il colorante e le proteine in soluzione, che determina un cambiamento di colore in risposta a varie concentrazioni di proteine. Ciò dipende dalla capacità del reattivo di legarsi principalmente ai residui amminoacidici aromatici o basici, come l'arginina. Il complesso, così formato, causa uno shift nel picco di assorbimento del colorante da 465 a 595nm.

Tale metodica è piuttosto semplice e rapida nell'esecuzione e può essere utilizzata con differenti Buffer di lisi, in quanto il reagente Bradford è compatibile con vari agenti riducenti, utilizzati spesso nei Buffer di lisi per stabilizzare le proteine in soluzione.

Al fine di costruire una curva standard di riferimento, sono state analizzate concentrazioni note di albumina sierica bovina (BSA), nelle stesse condizioni.

Il protocollo standard consiste nel miscelare 1 parte del campione proteico con 30 parti del reagente Bradford. Il campione potrebbe essere un bianco, una proteina standard o un campione non noto: il bianco consiste nel Buffer privo di proteine, la proteina standard in una proteina a concentrazione nota e il campione non noto rappresenta la soluzione che deve essere determinata. Il saggio è comunemente realizzato a temperatura ambiente e richiede un'incubazione del campione in Bradford dai 5 ai 20 minuti. Il cambiamento di colore della soluzione (da giallo/marrone a blu/viola) inizia immediatamente con l'incubazione. La lettura del campione viene realizzata alla lunghezza d'onda di 595nm e la concentrazione delle proteine viene determinata per comparazione con la curva standard.

4.6 SDS-PAGE e Western blot

Per verificare l'espressione delle proteine umane SOD1 e VAPB wt e mutate ed identificare i marcatori dello stress ossidativo e dell'apoptosi, attivati durante il processo di degenerazione cellulare, è stata realizzata una corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in SDS, seguita da Western blot.

La metodica consiste di tre fasi principali:

1) Preparazione del campione: l'estratto proteico precedentemente ottenuto dalle linee cellulari umane e murine, viene addizionato di *Laemmli buffer* 1% (Tris-HCl 50mM pH 6.8, SDS 1%, Glicerolo 10%, β -mercaptoetanolo 1%, Blu di Bromofenolo), denaturato a 95°C per 5 minuti e poi viene separato nelle singole componenti proteiche attraverso Elettroforesi standard su gel di SDS e poliacrilammide (SDS-PAGE);

2) SDS-PAGE: le proteine (15 μ g) sono caricate in uno *stacking gel* al 4% di acrilammide/bisacrilammide (30%: 0.8%) e poi separate in un *running gel* al 12,5%, preparato secondo il protocollo Bio-Rad. L'elettroforesi è realizzata in Running buffer (Tris-HCl 25mM pH 7.8, Glicina 2M, SDS 1%), applicando un amperaggio costante pari a 40mA per una durata di circa 3 ore, in modo tale da consentire una netta separazione delle proteine;

3) Western blot: dopo la corsa elettroforetica, le componenti proteiche sono trasferite in una membrana di polivinilidene (PVDF, Amersha), precedentemente attivata in Metanolo, per un'ora e mezzo in Transfer buffer (Tris-base 2.5M, Glicina

2M, Metanolo 100%) con amperaggio pari a 200mA. La membrana viene poi incubata per 30 minuti in Blocking solution (PBS 1 X, Tween-20 0.05%, latte 3%) a RT e successivamente incubata overnight con gli anticorpi primari, diluiti in Blocking solution.

I complessi proteina-anticorpo primario sono rilevati attraverso incubazione con i rispettivi anticorpi secondari, coniugati con la perossidasi (HRP HorseRadish Peroxidase), per un'ora e mezza a RT. Dopo tre lavaggi in PBS-Tween 0.05%, le proteine sono visualizzate con il metodo della chemiluminescenza (Thermo Fisher "Super Signal Pico" e "Super Signal Fento"), seguito dall'analisi densitometrica attraverso il software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). Il segnale è normalizzato contro il segnale ottenuto da una seconda incubazione della stessa membrana con un anticorpo per la β tubulina, usata come proteina "house-keeping".

4.7 Sintesi della Nanoceria

Sono stati dissolti 7×10^3 mg di $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in 20ml di 2-propanolo (99,7%, Carlo Ebra) e successivamente sono stati aggiunti 0.5ml di acido idrocloridico (HCl 1 M, Sigma Aldrich). La soluzione è stata incubata in agitazione a RT al fine di ottenere una soluzione omogenea. Contemporaneamente, 2×10^3 mg di urea e 0.5ml di HCl sono stati dissolti in 20ml di 2-propanolo e incubati a RT per 5 minuti. Tale soluzione è stata poi aggiunta, goccia a goccia, alla soluzione $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ in agitazione e, subito dopo, sono stati aggiunti 14ml di ammoniaca acquosa 5M (Sigma Aldrich) per formare un precipitato, esposto successivamente a microonde per 4 volte a 600W per 10 secondi ciascuna.

Il precipitato è stato quindi lavato in acqua e centrifugato a 10000 rpm: è stata ottenuta così una soluzione densa di colore giallo chiaro, che, diluita in acqua fino ad ottenere una concentrazione di 56mg di CeO_2 /ml, è stata utilizzata come soluzione stock nei successivi trattamenti e analisi.

4.8 Funzionalizzazione della Nanoceria con fluoresceina isotiocianato (FITC)

La Nanoceria è stata funzionalizzata con 3-ammino-propil-triet-ossilano (APTES 99%, Sigma Aldrich), miscelando 200mg di Nanoceria con 3ml APTES e 50ml di Etanolo (99.8% Fluka). La Nanoceria amino-funzionalizzata (NH₂-CeONPs) è stata lavata in Etanolo e centrifugata a 10000 rpm. Un'aliquota di Nanoceria è stata poi risospesa in Dimetil-formammide (DMF, Sigma Aldrich) e, successivamente, incubata con FITC 2mg/ml in DMF per 4 ore a RT. La FITC-NH₂-CeONPs è stata successivamente lavata una volta in Acetone e due volte in acqua e centrifugata a 10000 rpm.

Il precipitato di colore arancione è stato, infine, diluito in acqua alla concentrazione di 22mg/ml.

4.9 Caratterizzazione della Nanoceria

Le soluzioni di Nanoceria, NH₂-Nanoceria e FITC-NH₂-Nanoceria sono state caratterizzate mediante tecnica XRD (Diffrazione a Raggi X). Questa permette di determinare la cristallinità di un solido o di un componente, stimare la grandezza dei microcristalli presenti, il tipo di fasi, le dimensioni e il tipo di atomi del solido.

Nella presente tesi sono state effettuate analisi XRD su sospensioni di Nanoceria con lo scopo di determinare le fasi cristalline presenti e le dimensioni delle nanoparticelle.

Le analisi sono state eseguite con lo spettrofotometro Bruker D8 "Discover", dotato di un particolare sistema di rivelazione rapida, in grado di fornire in pochi secondi di acquisizione spettri con miglior rapporto segnale/rumore rispetto ai normali rilevatori.

I parametri con cui sono state effettuate le analisi sui campioni sono: 2θ =da 20° a 80°, tempo di acquisizione di 0.5s e frequenza di acquisizione pari a 0.02°/s.

Per effettuare l'analisi XRD, il campione non è stato utilizzato tal quale, ma è stata utilizzata solamente la parte di nanoparticelle concentrate per centrifugazione a 1500 giri/min con filtri Millipore. Il campione è stato poi depositato su un vetrino ed essiccato a 80° per qualche minuto. Per aumentare la concentrazione di metallo e rendere più omogeneo il campione sono state fatte diverse deposizioni successive.

Le immagini delle nanoparticelle sono state acquisite attraverso il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) Hitachi H-70000.

4.10 Valutazione dell'uptake della Nanoceria nelle cellule NSC

Per valutare l'uptake cellulare è stata utilizzata una Nanoceria funzionalizzata con il fluorocromo fluoresceina isotiocianato isomero I (FITC, $C_{21}H_{11}NO_5S$, 90%, Sigma Aldrich), al fine di verificare la distribuzione della stessa nell'ambiente intra ed extra-cellulare.

In particolare, le cellule sono state esposte per 48 ore a differenti concentrazioni di FITC-NH₂-CeONPs (20-50-100µg/ml) in piastra Multiwell da 24 pozzetti ($1.2 \cdot 10^5$ cellule per pozzetto). Dopo incubazione, le cellule sono state lavate tre volte in PBS e risospese in terreno di coltura DMEM/F-12 addizionato di trypan blue 0.25%.

L'uptake cellulare della FITC-NH₂-CeONPs sulle tre linee di NSC-34 è stato valutato attraverso citometria a flusso (BD FACS Canto™) e spettroscopia Raman.

I dati ottenuti dalla citometria a flusso sono stati analizzati con il Software Cell Quest 6.0 (BD Bioscience).

Invece, per l'analisi Raman, le NSC-34 sono state seminate su vetrini rivestiti di gelatina (1mg/ml in acqua sterile) alla concentrazione di 10^5 cellule per ml e lasciate in coltura per 24 ore. Successivamente, le cellule sono state trattate con FITC-NH₂-CeONPs (40µg/ml) per altre 24 ore. Infine, le cellule sono state lavate in PBS ed osservate al microscopio.

La localizzazione intracellulare è stata rilevata con microscopio confocale Bruker SENTERRA Raman (50x), utilizzando un laser di lunghezza d'onda di eccitazione pari a 532nm a 12mW di potenza. Ogni spettro Raman è stato registrato mediando 10 acquisizioni di 3 secondi.

4.11 Saggio MTT per la vitalità cellulare

Il saggio MTT, il cui acronimo indica il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio, è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT ad un sale, denominato Formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. Può essere utilizzato per determinare la citotossicità di farmaci o altre sostanze chimicamente attive e potenzialmente tossiche. All'interno dei mitocondri, l'enzima succinato deidrogenasi ha la capacità di tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) determinando, di conseguenza, la formazione di Formazano. Tale reazione si verifica, ovviamente, nelle sole cellule vive ed è valutata e misurata mediante lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570nm.

Per valutare l'effetto della Nanoceria sulla vitalità cellulare, le NSC-34 sono state esposte per 48 ore a differenti concentrazioni di nanoparticelle (5-5000µg/ml) in piastra multiwell 24 (10⁵ cellule/pozzetto). Come controllo di riferimento sono state utilizzate cellule NSC-34 non esposte a Nanoceria.

La vitalità cellulare è stata valutata con il saggio MTT, tramite il quale si è potuta determinare la percentuale di cellule vive capaci di convertire il colorante solubile MTT in cristalli di Formazano insolubili e di colore blu. In particolare, l'MTT (98% Sigma Aldrich) 1mg/ml è stato aggiunto alle cellule in coltura per 4 ore a 37°C. A seguire, le cellule sono state staccate con tripsina, lavate in PBS e centrifugate a 4000 rpm per 10 minuti. I pellet risultanti sono stati risospesi in 2ml di Isopropanolo e centrifugati a 4000 rpm per 5 minuti. A questo punto, il surnatante è stato letto a 578nm usando un lettore di micropiastre.

Prima di ciascun esperimento, è stata realizzata una curva standard di calibrazione, utilizzando differenti concentrazioni di cellule.

4.12 Analisi dell'apoptosi cellulare

Per valutare le proprietà neuroprotettive della Nanoceria, le cellule NSC ON, WT e 93 sono state piastrate alla concentrazione di 60x10³ per pozzetto ed indotte all'espressione del gene per la SOD1 umana wt e mutata, mediante incubazione a 37°C con Doxyciclina 1µg/ml per 48 ore. Contemporaneamente, anche i fibroblasti murini ed umani sono stati piastrati alla confluenza di 60 * 10³ per pozzetto.

Successivamente, le cellule sono state pre-trattate con differenti concentrazioni di Nanoceria (10, 20, e 40 µg/ml) per 24 ore a 37°C. Ciò consente alle nanoparticelle di essere in parte inglobate dalle cellule e, in parte, distribuirsi nell'ambiente esterno circostante. Dopo il trattamento con Nanoceria, le cellule sono state indotte all'apoptosi con Perossido di Idrogeno 100µM per 24 ore. Quindi, sono state lavate con Annexin V Binding Buffer (BD Pharmingen) e l'apoptosi cellulare è stata valutata usando due specifici marcatori, Annexin V marcata con Ficoeritrina (PE Annexin V, BD Biosciences) e 7AAD (PerCP - BD Biosciences).

In particolare, le cellule sono state incubate con PE-Annexin V e 7-AAD per 20 minuti, al buio a RT e poi risospese in FACS Flow, pronte per la lettura al citometro BD FACS Canto. Per ogni campione sono stati raccolti 20.000/30.000 eventi.

Attraverso il Software Cell Quest 6.0 (BD Biosciences), le percentuali di cellule Annexin V+/7AAD- e Annexin V+/7AAD+ sono state utilizzate per identificare le cellule vive, apoptotiche e in necrosi.

4.13 Analisi della localizzazione della Nanoceria al microscopio confocale

Le cellule NSC-34 sono state messe in coltura per 24 ore su vetrini rivestiti di gelatina (1mg/ml in acqua sterile) alla concentrazione di 10⁵ cellule per ml. In seguito, le cellule sono state trattate con FITC-NH₂-CeONPs (10 o 20µg/ml) per ulteriori 24 ore. Quindi, sono state lavate due volte in PBS e colorate in DAPI (5µg/ml in PBS) per 15 minuti e lontano dalla luce. Dopo incubazione, le cellule sono state ulteriormente lavate in PBS e i vetrini allestiti sono stati osservati con microscopio confocale Leica, fornito di Sistema Laser C2s. Le immagini sono state analizzate mediante specifico software Leica Application Suite Advance Fluorescence Lite (LAS AF).

4.14 Valutazione dell'apoptosi mediante citometria a flusso

La citometria a flusso è stata utilizzata per valutare il grado di vitalità cellulare e di apoptosi delle cellule NSC-34, dei fibroblasti murini e umani pre-trattati con Nanoceria e successivamente con H₂O₂ come agente di induzione dello stress ossidativo.

In particolare, dopo il trattamento, le cellule sono state raccolte e lavate in Annexin V Binding Buffer, centrifugando a 1600rpm per 10 minuti a 4°C.

Una volta eliminato il surnatante, la miscela contenente PE-Annexin V e PercP-7AAD è stata aggiunta ai pellet ed incubata per 20 minuti al buio a RT. Quindi, dopo l'aggiunta di FACS Flow, i campioni sono stati analizzati mediante citofluorimetro.

Anche l'analisi sui PBMC di pazienti SLA, Parkinson e controlli è stata realizzata mediante citofluorimetria per verificare la presenza di aggregati di VAPB.

In questo caso, 1×10^6 PBMC sono stati trattati per 20 minuti con Triton X 100 0.1% in PBS per permeabilizzare le membrane cellulari, consentendo all'anticorpo di entrare all'interno delle cellule stesse. In seguito, è stato eseguito un lavaggio in PBS-BSA 1% con centrifugazione a 2000 rpm per 10 minuti. I pellet cellulari così ottenuti sono stati incubati con l'anticorpo primario anti-VAPB (diluizione 1:100) per 30 minuti e lavati in PBS-BSA 1%. Infine, le cellule sono state marcate con una soluzione contenente alcuni marcatori CD, indispensabili per l'identificazione delle popolazioni di PBMC (CD8-APC Cy-7, CD21 PE, CD20 PE, CD14 PerCP, CD3 APC), e l'anticorpo secondario FITC-anti-human IgG per 30 minuti al buio a RT. Dopo aver rimosso l'eccesso di anticorpi, attraverso un ulteriore lavaggio in PBS-BSA 1%, i pellet sono stati risospesi in FACS Flow ed analizzati al citofluorimetro.

4.15 Immufluorescenza su cellule HeLa

Le cellule HeLa transfettate con VAPB^{WT/P56S} sono state dapprima fissate con Paraformaldeide (PFA, Sigma) 4% per 20 minuti a RT e poi permeabilizzate con Triton X-100 0,1% per 15 minuti a RT. A questo punto, i siti aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione delle cellule con una Blocking Solution (PBS-latte 4%) per 30 minuti e, successivamente, le cellule sono state incubate con specifici anticorpi primari overnight a 4°C. Il giorno seguente, sono stati aggiunti gli anticorpi secondari (diluizione 1:500) per 2 ore a RT. Contemporaneamente i nuclei sono stati marcati con Hoechst 33342 (1µg/ml) e, infine, i campioni sono stati trasferiti su vetrini per l'analisi al microscopio. Le immagini sono state visualizzate al microscopio confocale Zeiss LSM 700 e processate mediante i software Zeiss LMS e Adobe Photoshop CS5.

4.16 Immunofluorescenza su PBMC

Un'aliquota di PBMC (1×10^6) e di fibroblasti (150×10^3), isolati rispettivamente dal sangue periferico e dalle biopsie cutanee di pazienti SLA, Parkinson e controlli, sono stati fissati con paraformaldeide al 4% (Sigma Aldrich) per 10 minuti a RT, e poi permeabilizzati con Triton X-100 0,1% in PBS per 10 minuti a RT. Dopo incubazione, le cellule sono state lavate con PBS-BSA 1% e centrifugate a 1200rpm per 10 minuti. I pellet ottenuti sono stati incubati con l'anticorpo primario contro VAPB (Abcam, 1:500 PBS/1% BSA) per 30 minuti e lavati in PBS-BSA 1%. Successivamente, i pellet sono stati incubati con l'anticorpo secondario FITC-anti Rabbit (Sigma, 1:200 PBS/1% BSA). Dopo lavaggio con PBS, sono stati montati i vetrini con DAPI (ProLong Gold antifade reagent, Molecular Probes) e il segnale fluorescente è stato rilevato al microscopio confocale Leica (Leica Microsystems Srl Italy).

4.17 Analisi Statistiche

Tutti i dati derivano da almeno tre esperimenti indipendenti e i risultati sono espressi come valori di media \pm deviazione standard. La significatività statistica dei differenti risultati tra i gruppi trattati e controllo è stata stimata con test accoppiati ed indipendenti nel programma GraphPad Prism 5.0. I dati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $p < 0.05$.

Le immagini dei Western Blot sono rappresentative di tre analisi eseguite su campioni provenienti da almeno tre esperimenti separati.

CAPITOLO 5: Risultati e Discussione

5.1 Analisi delle cellule NSC-34 come modello cellulare di SLA 1

Dopo induzione con Doxyciclina per 48 ore, le cellule NSC-34 transfettate con il gene umano per la SOD1^{WT/G93A} (NSC WT e 93), hanno manifestato un efficiente livello di espressione della SOD1 endogena (19 kDa) e della proteina umana SOD1 (23 kDa). Le cellule NSC ON, invece, hanno espresso esclusivamente la SOD murina endogena (Fig. 26).

Tale risultato conferma l'efficienza e la stabilità del sistema inducibile Tet-ON (Fig.1) e, quindi, rende queste cellule "motor neuron-like" immortalizzate un buon modello per lo studio della neurotossicità, dei meccanismi fisiopatologici della SLA e della degenerazione motoneuronale associata alla forma mutata della SOD1 umana.

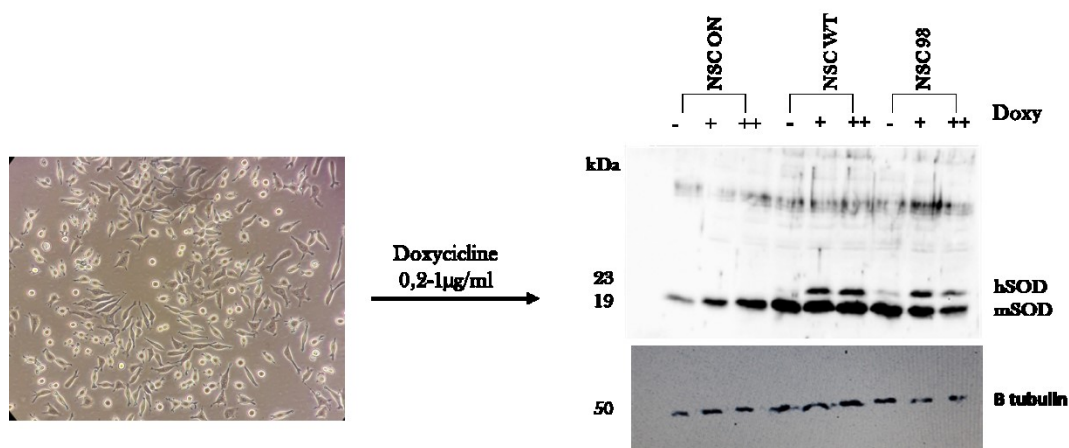


Fig. 26 In seguito all'induzione con Doxyciclina per 48 ore a 37°C, le cellule mostrano una stabile espressione della SOD1 endogena ed umana nella forma wt e mutata. Per l'analisi di Western blot sono stati utilizzati un anticorpo anti-SOD1 Cu/Zn, che riconosce entrambe le forme murina e umana della SOD1, e un anticorpo diretto contro la tubulina, utilizzata con proteina house-keeping.

5.2 Sintesi e caratterizzazione della Nanoceria

La scelta del metodo di sintesi delle nanoparticelle è fondamentale, in quanto le principali proprietà, quali forma e dimensioni degli aggregati in sospensione, dipendono da esso. È possibile, quindi, ottimizzare i vari stadi del procedimento sintetico a seconda delle proprietà che si vogliono conferire al materiale finale, controllando i seguenti parametri:

- dimensioni delle particelle
- forma
- composizione
- grado di agglomerazione (nel caso siano sistemi colloidali).

Nel presente lavoro, la Nanoceria è stata sintetizzata attraverso un trattamento in microonde, processo che consente una rapida sintesi di nanoparticelle ben disperse in fase acquosa, mediante un annealing termico (21).

Dopo la sintesi, le nanoparticelle sono state caratterizzate mediante analisi XRD (diffrazione ai raggi X) e microscopia elettronica a trasmissione (TEM), al fine di valutarne la struttura chimico-fisica, che è peraltro correlata alle loro proprietà funzionali. Il risultato ha rivelato una dimensione del cristallo delle nanoparticelle attorno ai $9\pm 1\text{nm}$ e tale dato è in accordo con il diametro delle nanoparticelle determinato mediante l'analisi al TEM ($8.5\pm 1.3\text{nm}$), suggerendo, in definitiva, che tali nanoparticelle sono formate da singoli cristalli (Fig. 27).

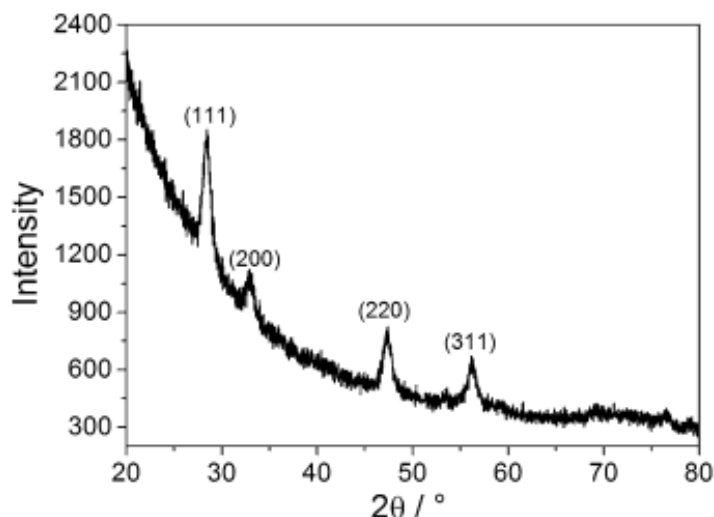


Fig. 27 XRD pattern della Nanoceria sintetizzata con trattamento a microonde

5.3 Funzionalizzazione della Nanoceria

Per la funzionalizzazione della Nanoceria con il fluoroforo FITC è stata utilizzata la spettroscopia a raggi infrarossi.

Come evidente dalla **Fig. 28**, lo spettro delle nanoparticelle è nel range che va da 3700 a 400 cm^{-1} .

La banda larga con il picco a 3450 cm^{-1} corrisponde all'assorbimento simmetrico (symmetric stretching) del gruppo idrossilico sulla superficie delle nanoparticelle (Lord MS. 2012), mentre la banda a 1600 cm^{-1} è dovuta alla presenza di acqua residua. Le bande sotto 1460 cm^{-1} (1465, 1319 e 1045 cm^{-1} rispettivamente) sono state attribuite alla formazione di CO_3^{2-} sulla superficie delle particelle come conseguenza dell'interazione tra CeO_2 e la CO_2 atmosferica (23). Se le nanoparticelle sono mantenute in soluzione, la presenza di queste bande è fortemente ridotta.

La funzionalizzazione della Nanoceria con FITC è stata ottenuta attraverso modificazioni chimiche della superficie delle nanoparticelle con un legante organosilano, l'APTES (3-amminopropiltrirossisilano), che contiene un gruppo $-\text{NH}_2$ terminale.

La **Fig. 28b** mostra un cambiamento nello spettro infrarosso dovuto alle modificazioni indotte dall'APTES. La banda corrispondente al picco 3450 cm^{-1} diminuisce in assorbanza, per la ridotta quantità di gruppi idrossili disponibili sulla superficie delle nanoparticelle; mentre l'aggiunta di gruppi ammino-silani è confermata dalla presenza di tre bande: la prima, a 1556 cm^{-1} , attribuibile alla flessibilità del gruppo NH del legame amminico; la seconda, corrispondente a 2966 cm^{-1} , dovuta al CH_3 *stretching* e l'ultima banda a 2932 cm^{-1} , correlata a CH_2 *stretching*. La banda corrispondente a 952 cm^{-1} è correlata al Ce-O-Si *stretching*, come conseguenza del legame covalente tra l'APTES e la Nanoceria.

La **Fig. 28d** mostra lo spettro della NH_2 -Nanoceria funzionalizzata con FITC. Comparando lo spettro del solo fluoroforo (**Fig. 28c**) con quello delle nanoparticelle funzionalizzate con FITC, è stata osservata la scomparsa della banda relativa al gruppo isotiocianato N=C=S (2069 cm^{-1}), come risultato del legame con il gruppo amminico del FITC.

Inoltre, mettendo a confronto gli spettri della **Fig. 28d/c**, è stato evidenziato un incremento del CH_2 *stretching* band a 2930 cm^{-1} , da attribuire al legame della molecola fluorescente con le nanoparticelle di Ceria (24).

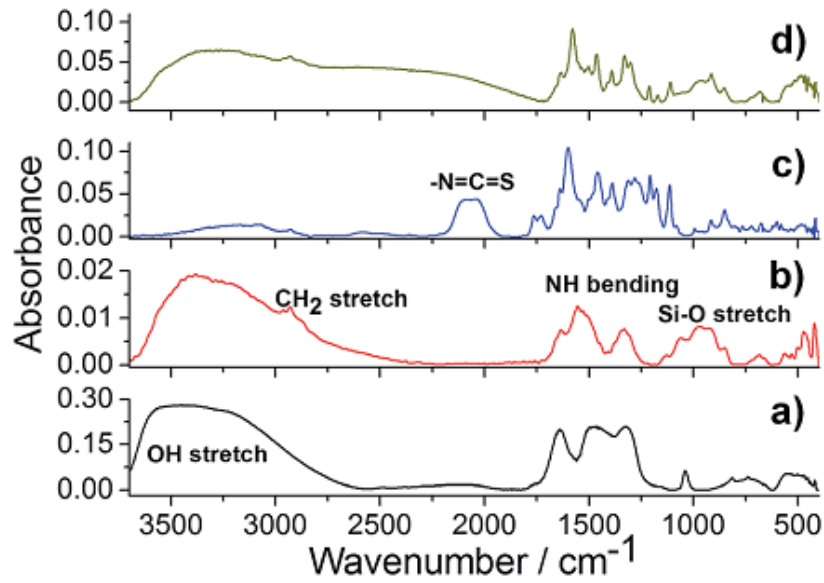


Fig. 28 Spettro di assorbimento nel range 3700-400 cm^{-1} : **a)** Nanoceria (linea nera), **b)** Nanoceria funzionalizzata con APTES (linea rossa), **c)** FITC-Nanoceria (linea blu) e **d)** Nanoceria funzionalizzata con APTES e FITC (linea verde)

5.4 Valutazione della tossicità della Nanoceria nelle cellule neuronali

Per valutare la tossicità della Nanoceria, le cellule NSC-34 sono state esposte a concentrazioni crescenti di nanoparticelle (da 0 a 5000 $\mu\text{g/ml}$) e la vitalità cellulare è stata determinata attraverso il saggio MTT.

Come mostrato nella **Fig. 29**, la Nanoceria non influenza la vitalità cellulare, quando è somministrata alle concentrazioni da 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$, mentre inizia ad essere tossica a concentrazioni superiori a 100 $\mu\text{g/ml}$. Questo si traduce in una riduzione statisticamente significativa ($p < 0.05$) della vitalità cellulare, che diminuisce gradualmente rispetto ai controlli, dal 75% al 57%, con somministrazioni della Nanoceria a concentrazioni rispettivamente di 500 $\mu\text{g/ml}$ e 4000 $\mu\text{g/ml}$.

Il saggio MTT, inoltre, ha permesso di valutare la massima concentrazione di nanoparticelle che non induce tossicità alle cellule.

A seguito di questi risultati, è stato scelto un range, tra 20 e 100 $\mu\text{g/ml}$, per valutare l'effetto antiossidante delle nanoparticelle mediante un saggio dell'apoptosi su colture cellulari precedentemente esposte a stress ossidativo.

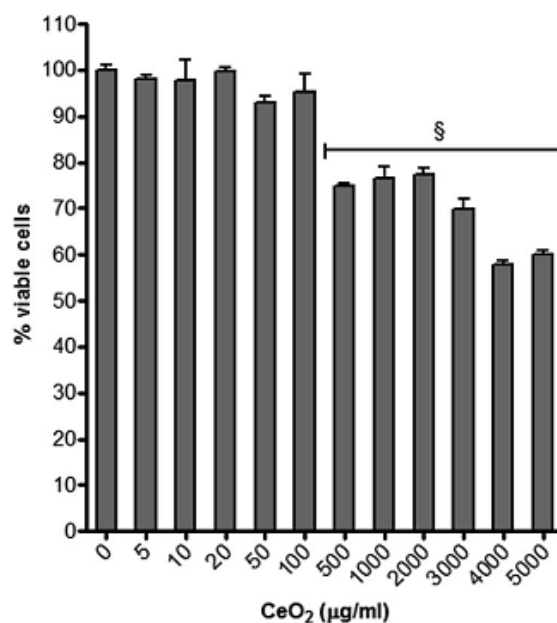


Fig. 29 Effetto della Nanoceria (5-5000 $\mu\text{g/ml}$) sulla vitalità cellulare nelle NSC-34 per 48 ore con il saggio MTT.
§= $p < 0.05$ contro il gruppo controllo

Del range selezionato come non tossico per le cellule, sono state testate cinque differenti concentrazioni (10-20-30-40-50 μ g/ml), escludendo valori troppo elevati di Nanoceria, seppur non tossici per le cellule, per poter ulteriormente individuare una concentrazione ottimale di Nanoceria non tossica e capace di esercitare le proprie funzioni antiossidanti.

Come mostrato in **Fig. 30**, nelle colture NSC 93 non esiste differenza statisticamente significativa tra la vitalità cellulare del controllo rispetto a quella riscontrata nei trattamenti con le cinque differenti concentrazioni di Nanoceria. Nelle colture NSC WT, invece, esiste una differenza significativa ($p < 0.05$) tra il controllo e le concentrazioni di Nanoceria superiori a 30 μ g/ml. Infine, nelle colture NSC ON, la Nanoceria riduce significativamente ($p < 0.05$) la vitalità cellulare.

Dai dati ottenuti è emerso che la concentrazione ottimale di Nanoceria non tossica per le cellule (ad esclusione delle NSC ON) è la 20 μ g/ml, che quindi è stata scelta per verificare l'effetto neuroprotettivo nei successivi esperimenti.

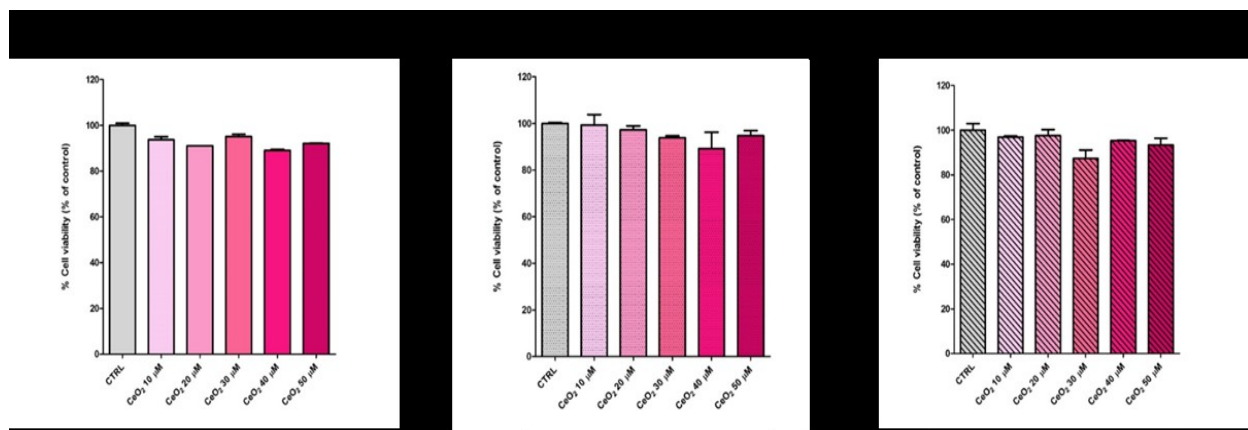


Fig. 30 Saggio MTT 24h in colture cellulari NSC ON, WT e 93 trattate con Nanoceria 10-20-30-40-50 μ g/ml

5.5 Uptake e localizzazione della Nanoceria nelle colture cellulari

Per valutare l'uptake della Nanoceria, le cellule, precedentemente trattate e poi fissate sui vetrini, sono state analizzate mediante spettroscopia Raman. L'informazione ottenuta con microscopio Raman è rappresentata graficamente dal diagramma (spettro di Raman) in **Fig. 31a**, il quale evidenzia una differenza di spettro tra l'ambiente intracellulare, che ha inglobato la Nanoceria (linea nera) e l'ambiente extracellulare, dove non sono state identificate nanoparticelle (linea rossa). L'immagine a destra della **Fig. 31a** mostra chiaramente la presenza di Ossido di Cerio all'interno delle cellule, dovuto all'uptake delle nanoparticelle, mentre nessun segnale attribuibile alle nanoparticelle è visibile nell'ambiente extracellulare.

Ciò conferma che la Nanoceria è stata inglobata dalle cellule ed è realmente presente all'interno delle stesse.

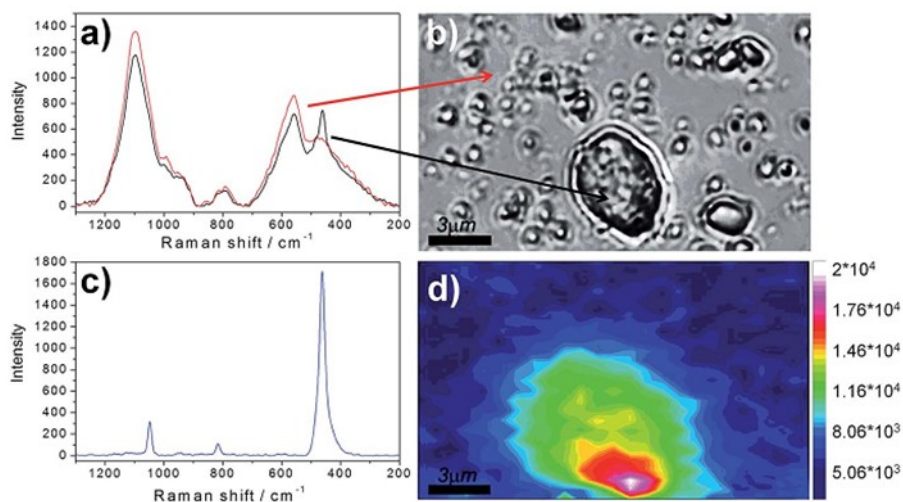


Fig. 31 Analisi Raman delle cellule NSC incubate con Nanoceria. **a)** Spettro Raman nel range 1300-200 cm^{-1} dell'ambiente extracellulare (linea rossa) ed intracellulare (linea nera); **b)** Immagine di una singola cellula NSC in coltura ed in presenza di Nanoceria; **c)** Spettro Raman della Nanoceria in soluzione acquosa

Anche l'analisi al microscopio confocale conferma l'internalizzazione della Nanoceria nelle cellule NSC-34 (**Fig. 32**). Dopo 24 ore di incubazione con 20ug/ml di FITC-Nanoceria, un'elevata fluorescenza di colore verde nel citoplasma cellulare conferma l'avvenuta internalizzazione della Nanoceria, senza tuttavia mostrare una localizzazione nucleare della Ceria.

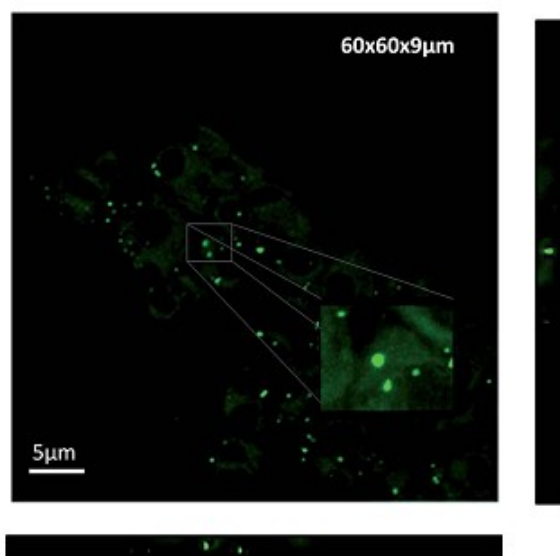


Fig. 32 Immagine 3D ottenuta mediante analisi al microscopio confocale, che conferma l'internalizzazione della Nanoceria (in verde) nelle cellule NSC in coltura

5.6 Valutazione dello stress ossidativo

Per indurre lo stress ossidativo, fattore indispensabile del processo di degenerazione tipico della SLA, è stato utilizzato il perossido di idrogeno (H_2O_2) alla concentrazione di 100 μ M, scelta come concentrazione ottimale in grado di indurre un soddisfacente livello di apoptosi e di mortalità cellulare rispetto al controllo non trattato.

Per selezionare tale concentrazione di perossido di idrogeno, le colture cellulari NSC WT e 93 sono state trattate con differenti concentrazioni di perossido di idrogeno (50-100-200 μ M) per 1 ora e 24 ore. La percentuale di cellule apoptotiche è stata identificata con citometria a flusso.

I dati riportati in **Tab. 5** dimostrano che dei tre trattamenti con H_2O_2 sulle cellule NSC incubate per 24 ore, quello con la concentrazione 100 μ M rappresenta il miglior compromesso sia in termini di apoptosi (27,6% in più rispetto alle cellule non trattate), sia in termini di vitalità e, quindi, di sopravvivenza cellulare (dati non mostrati).

5.7 Effetto della Nanoceria sul danno ossidativo

Per valutare se la Nanoceria possa avere un effetto antiossidante sui modelli cellulari di SLA, le cellule NSC 93, pre-trattate con Nanoceria e successivamente esposte a stress ossidativo mediante H_2O_2 , sono state analizzate con citometria a flusso. In particolare, è stata studiata la presenza di fosfatidilserina sulla membrana plasmatica cellulare (segno di apoptosi precoce) e l'ingresso del colorante vitale 7-AAD nelle cellule (segno di apoptosi tardiva).

La **Fig. 33** riporta un citogramma 7AAD/Annexin V rappresentativo corrispondente alle colture cellulari di NSC 93 trattate con CeO_2 e H_2O_2 . In tutti i trattamenti con Nanoceria è evidente un decremento significativo della percentuale di cellule in apoptosi rispetto al controllo positivo, trattato esclusivamente con H_2O_2 100 μ M ($p < 0.05$). In particolare, il campione trattato con Nanoceria 20 μ g/ml (39.65 ± 0.75) evidenzia una riduzione del 45% rispetto al controllo positivo (87.9 ± 0.35) e tale riduzione è statisticamente significativa ($p = 0.03$). Anche i campioni trattati con Nanoceria 10 μ g/ml (26.75 ± 0.35) e 40 μ g/ml (32.95 ± 1.05) mostrano una riduzione di cellule apoptotiche rispettivamente del 30% e 38% ($p = 0.02$).

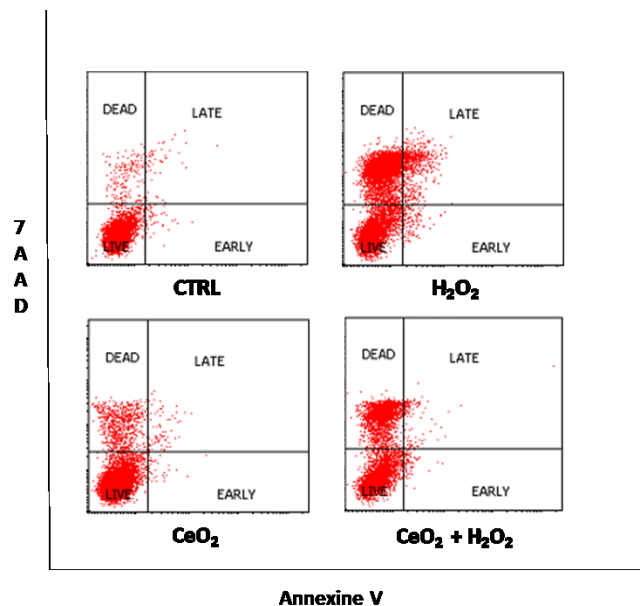


Fig. 33 Citogramma Annexin V/7AAD rappresentativo, corrispondente alle colture cellulari di NSC 93 trattate con CeO_2 e H_2O_2

Inoltre, la **Fig. 34** mostra l'effetto della somministrazione della sola Nanoceria a confronto col controllo negativo: i dati non evidenziano variazioni significative nell'apoptosi rispetto al controllo, in accordo con il saggio MTT. Ciò a conferma del fatto che la Nanoceria non risulta essere tossica per le cellule in cui è inglobata.

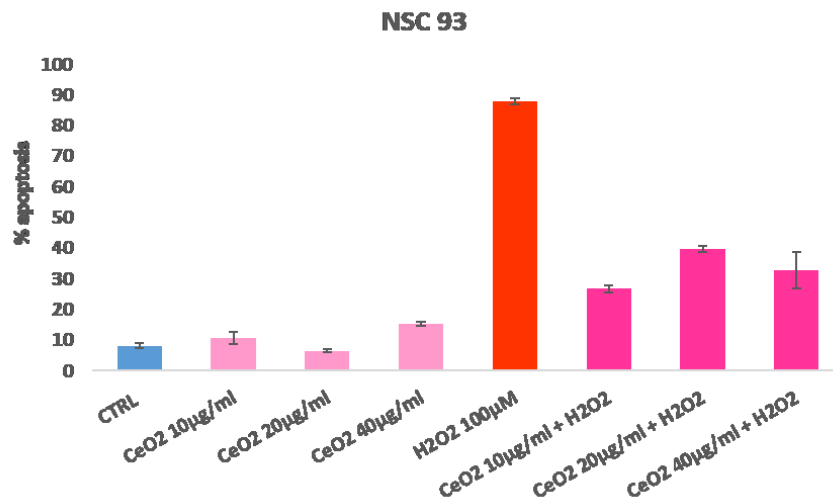


Fig. 34 Grafico a barre dell'effetto protettivo della Nanoceria nelle cellule NSC 93

Risultati simili sono stati ottenuti per le cellule NSC WT, utilizzate come “controllo sano” per la presenza della SOD1 umana ma nella forma wild-type.

Infatti, come evidenziato nella **Fig. 35**, i trattamenti con Nanoceria 10 e 20µg/ml mostrano una riduzione significativa della percentuale di apoptosi rispetto al controllo positivo ($p < 0.05$). Nello specifico, i campioni con Nanoceria 10µg/ml (15.10 ± 1.20) e 20µg/ml (11.95 ± 1.05) hanno una riduzione rispettivamente del 49% e 39% rispetto al controllo positivo (30.95 ± 1.05). Anche il campione trattato con Nanoceria 40µg/ml (19.15 ± 5.95) presenta una riduzione di apoptosi del 62% che, però, non risulta statisticamente significativa.

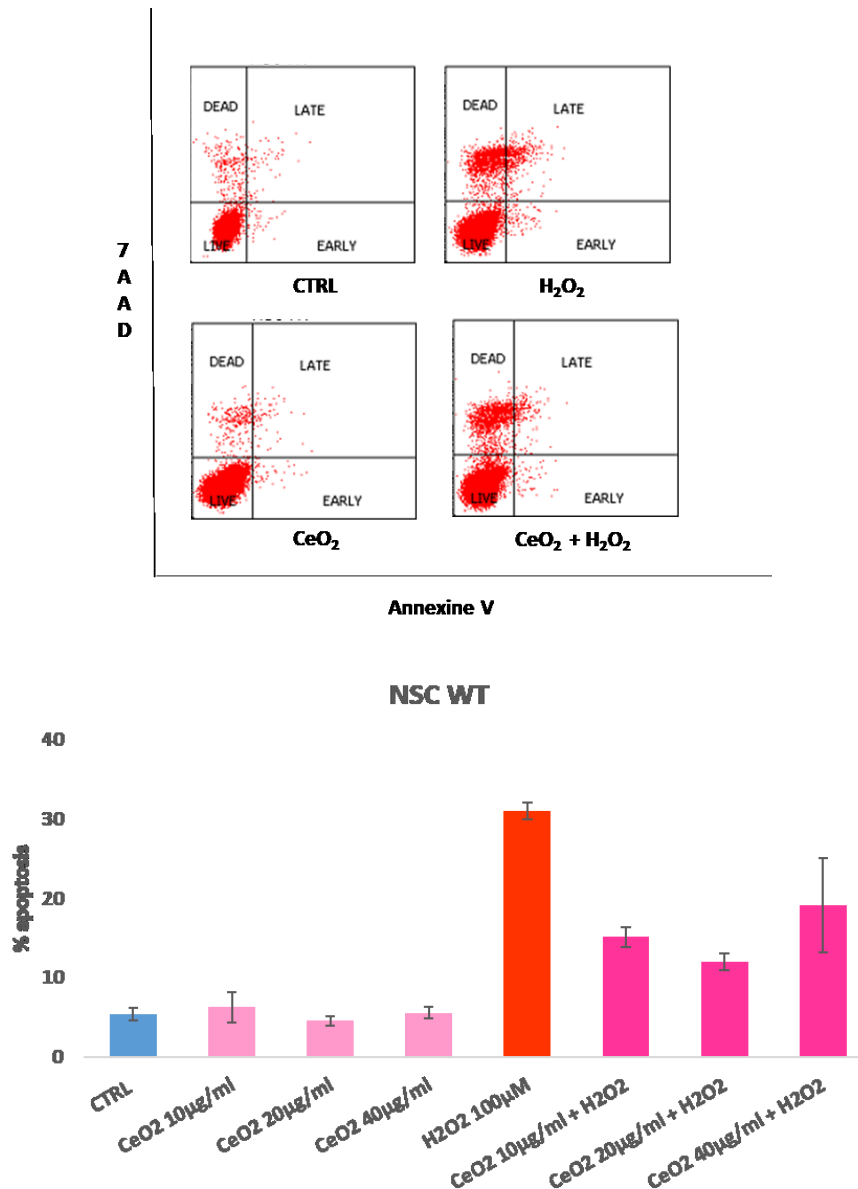


Fig. 35 Citogramma Annexin V/7AAD rappresentativo, corrispondente alle colture NSC WT trattate con Nanoceria e H₂O₂ (fig. in alto) e corrispondente grafico a barre (figura in basso)

Il trattamento con Nanoceria e H₂O₂ realizzato nei fibroblasti di pazienti SLA e nei controlli sani ha mostrato risultati paragonabili a quelli ottenuti nelle linee cellulari NSC-93 e WT in riferimento al ruolo antiossidante e protettivo della Nanoceria verso lo stress ossidativo che caratterizza la degenerazione motoneuronale (dati non riportati). Tuttavia, poiché per queste tipologie cellulari sono stati eseguiti solamente degli studi preliminari su un numero molto basso di campioni umani, si è preferito non riportare i dati ottenuti, in attesa di svolgere indagini più approfondite.

5.8 Analisi delle cellule HeLa come modello cellulare di SLA 8

Le cellule HeLa VAPB^{P56S} mostrano, in immunofluorescenza, una radicale riorganizzazione della struttura del RE (Fig. 36A), rispetto alle cellule HeLa VAPB^{WT}, utilizzate come controllo. Ciò conferma la presenza di aggregati citoplasmatici di proteine mal-ripiegate, che alterano le normali funzioni cellulari e conducono allo stress ossidativo.

Per un'analisi dei marcatori di stress cellulare è stato realizzato un Western blot, seguito da incubazione con gli anticorpi anti-GRP-78, anti-HSP-70, anti-P62 e anti-LC3 I e II (Fig. 36B). Le cellule HeLa^{P56S} mostrano un'elevata espressione di GRP78 e HSP70, rispettivamente marcatori dello stress del RE e citoplasmatico e, contemporaneamente, elevati livelli di p62 e LC3II, ad indicare difetti nel sistema autofagico cellulare.

Poiché la VAPB mutata risulta essere mal-ripiegata, forma aggregati insolubili nelle colture cellulari “*in vitro*” e stimola lo stress del RE, si è pensato di valutare lo stress cellulare e l'accumulo di proteine mal-ripiegate attraverso un anticorpo diretto contro l'ubiquitina, al fine di indagare se gli aggregati fossero marcati con l'ubiquitina per la degradazione e la clearance cellulare. Ciò ha rivelato un'elevata espressione di ubiquitina nelle cellule transfettate con VAPB^{P56S}, rispetto alle cellule transfettate con VAPB^{WT} e nelle cellule controllo transfettate con EGFP, suggerendo un incremento di stress indotto dall'accumulo di proteine mal-ripiegate, non eliminate dai sistemi cellulari deputati alla degradazione proteica (Fig. 36C).

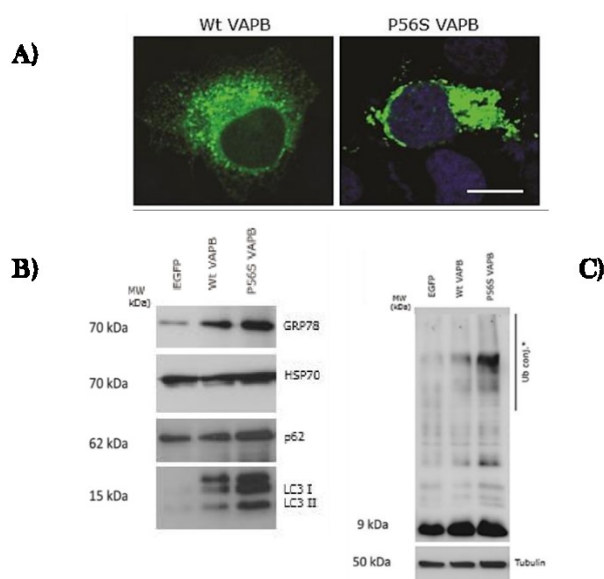


Fig. 36 A) analisi di immunofluorescenza delle cellule HeLa transfettate con VAPB^{WT/P56S} e riorganizzazione del RE indotta dalla proteina mutata. **B)** Western blot sulle cellule HeLa transfettate con VAPB per l'analisi dei marcatori di stress ossidativo ed autofagia (GRP78, HSP-70, p62 e LC3 I e II). **C)** Dimostrazione mediante Wb della presenza di proteine ubiquitinate in presenza di VAPB^{P56S} rispetto al controllo VAPB^{WT}

5.9 Presenza di aggregati di VAPB nei PBMC di pazienti sSLA

L'immunofluorescenza eseguita sui PBMC di pazienti sSLA, Parkinson e controlli sani, mediante uno specifico anticorpo diretto contro VAPB, mostra una sostanziale differenza tra pazienti e controlli (**Fig. 37**).

Nei pazienti sSLA è evidente un anello segmentato attorno al nucleo, dovuto alla presenza di aggregati di VAPB, che conferma quanto riportato in letteratura sulla riorganizzazione del RE. Inoltre, tale risultato riflette il pattern osservato in seguito ad immunofluorescenza nel modello cellulare VAPB^{P56S} (**Fig. 37A**).

Al contrario, nei PBMC dei pazienti Parkinson e dei controlli sani, la VAPB è distribuita come un anello continuo attorno al nucleo, confermando quanto osservato nelle HeLa transfettate con VAPB^{WT}.

La citometria a flusso, invece, non mostra una sostanziale differenza di espressione della VAPB nei PBMC di pazienti sSLA, Parkinson e controlli sani. Ciò conferma che la formazione e l'accumulo di aggregati di VAPB sono una conseguenza del mal-ripiegamento della proteina e non dell'iper-espressione della stessa.

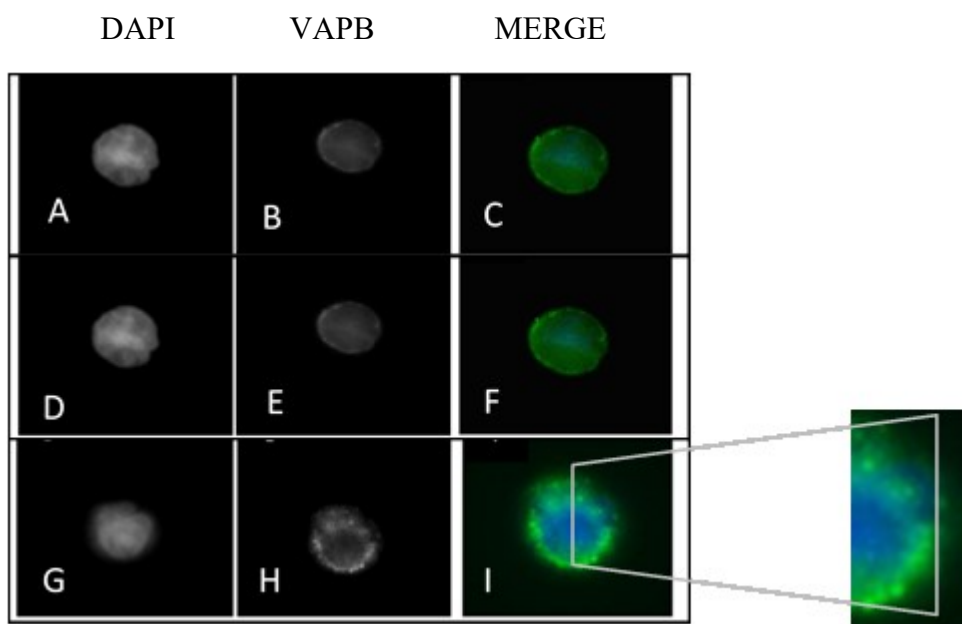


Fig. 37 Immunofluorescenza dei PBMC di pazienti SLA (G, H, I), controlli sani (A, B, C) e pazienti Parkinson (D, E, F) mediante anticorpo anti VAPB e DAPI per i nuclei. Nel pannello corrispondente ai pazienti SLA è ben evidente una riorganizzazione del RE, confermando quanto ottenuto nelle cellule murine in linea transfettate

5.10 Analisi Western blot su PBMC e fibroblasti umani

Le proteine citoplasmatiche isolate dai PBMC e dai fibroblasti di pazienti sSLA e fSLA, Parkinson e controlli sani sono state analizzate mediante Western blot, al fine di valutare l'espressione di marcatori dello stress cellulare.

Pertanto, è stato utilizzato un anticorpo contro la proteina Hsp90, indicatore di stress cellulare e uno specifico anticorpo diretto contro l'ubiquitina.

Come atteso, la proteina Hsp90 presenta alti livelli di espressione nei pazienti SLA e Parkinson e non nei controlli sani, a dimostrazione dell'intensa condizione di stress e danno cellulare della neurodegenerazione, rispetto ai controlli.

Per quanto riguarda, invece, l'ubiquitina, è evidente una iper-espressione in tutti i pazienti SLA e Parkinson, in quanto caratterizzati da accumulo citoplasmatico di proteine mal-ripiegate ed ubiquitinate. Nei controlli sani, seppur presente, l'ubiquitina è espressa a livelli normali ed è evidente come singola banda ben definita di 9kDa (**Fig. 38**).

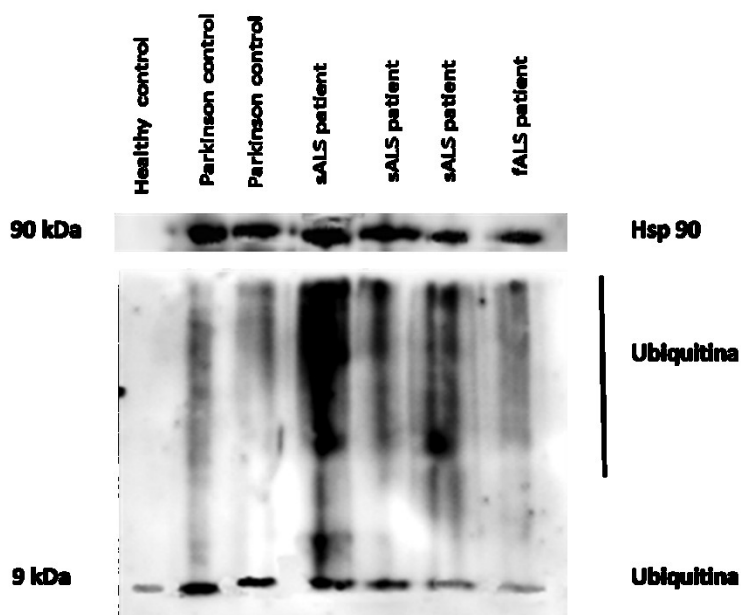


Fig. 38 Western blot con anticorpi anti Hsp90 e anti-Ubiquitina su pazienti SLA, Parkinson e controlli sani

CAPITOLO 6: Conclusioni

Il presente lavoro evidenzia un effetto neuroprotettivo delle nanoparticelle di Ossido di Cerio sia in modelli cellulari murini di SLA, caratterizzati da degenerazione indotta dal perossido di idrogeno ed accentuata dalla presenza della SOD1 nella sua forma mutata (G93A), sia in linee cellulari umane isolate da pazienti sardi affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica.

Il ruolo protettivo della Nanoceria dipende dalle dimensioni e concentrazioni delle nanoparticelle che influenzano la vitalità e il metabolismo cellulare. In particolare, si è osservato che più le dimensioni sono ridotte, più la Nanoceria penetra facilmente all'interno delle cellule, dove esplica la sua azione antiossidante. Per quanto riguarda, invece, la concentrazione, quando la Nanoceria è utilizzata a 10 e 20µg/ml non altera la vitalità cellulare e determina una riduzione significativa delle cellule apoptotiche, soprattutto di quelle in "late-apoptosis".

Dall'analisi di tutti i dati ottenuti è possibile affermare che la Nanoceria rappresenta un'applicazione terapeutica innovativa, nonostante siano indispensabili ulteriori studi per comprendere meglio i meccanismi biochimici ed antiossidanti che si verificano nell'ambiente intracellulare.

Inoltre, date le piccole dimensioni della Nanoceria e, quindi, la sua elevata abilità di attraversare la barriera emato-encefalica, sarebbe utile investigare anche sul suo ruolo come device farmacologico delle attuali e future terapie per la SLA.

Per quanto concerne l'approccio diagnostico di questa patologia, ancora oggi basato sull'esclusione di altre malattie neurodegenerative e muscolari, dalle analisi di immunofluorescenza è emersa la presenza di aggregati insolubili della VAPB mutata nel citoplasma dei PBMC di pazienti sSLA, rispetto a quanto osservato nei controlli sani e nei pazienti Parkinson. Inoltre, l'immunofluorescenza evidenzia una riorganizzazione del RE dovuto agli aggregati di VAPB, contrariamente a quanto osservato nei controlli sani e nei pazienti Parkinson, in cui il RE è distribuito in modo omogeneo nel citoplasma cellulare.

Tutti questi dati rafforzano l'ipotesi, già avanzata in altri studi, che la proteina VAPB sia coinvolta nei meccanismi patogenetici della SLA, sia nella forma familiare che in quella sporadica. Pertanto, l'immunofluorescenza potrebbe essere un utile ausilio diagnostico da impiegare in combinazione con le attuali tecniche diagnostiche della SLA.

CAPITOLO 7: Bibliografia

1. Alexianu ME. (2001) *Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression.* Neurology 57, 1282-1289
2. Aliaga L. (2013) *Amyotrophic Lateral Sclerosis-related VAPB P56S Mutation Differentially Affects the Function and Survival of Corticospinal and Spinal Motor Neurons.* HMG Advance Access
3. Allen S. (2003) *Analysis of the cytosolic proteome in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis reveals alterations to the proteasome, antioxidant defenses, and nitric oxide synthetic pathways.* The Journal of biological chemistry 278, 6371-6383
4. Andersen PM. (1997) *Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with Cu/Zn superoxide dismutase mutations in Scandinavia.* Brain: a journal of neurology 120, 1723-1737
5. Andersen PM. (2003) *Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes.* Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron. Disord. 4, 62-73
6. Andersen PM. (2006) *Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene.* Current neurology and neuroscience reports 6, 37-46
7. Anderson PM. (2008) *Stress granules: the Tao of RNA triage.* Trends in biochemical sciences 33, 141-150
8. Anirikh Chakrabarti (2011) *A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response.* Biotechnol Bioeng 108(12): 2777-2793
9. Antonsson B. (2000) *The Bcl-2 protein family.* Experimental cell research 256, 50-57
10. Arai T. (2006) *TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 351: 602±611
11. Arciello M. (2010) *Inactivation of cytochrome c oxidase by mutant SOD1s in mouse motoneuronal NSC-34 cells is independent from copper availability but is because of nitric oxide.* J Neurochem. 112(1):183-92
12. Ashish J. (2015) *p62/sequestosome-1, autophagy-related gene 8 and autophagy in Drosophila are regulated by Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), independent of transcription factor TFEB.* J. Biol. Chem. 290: 14945-14962
13. Aulas A. (2012) *Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP.* Molecular neurodegeneration 7, 54
14. Ayala YM. (2008) *Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43.* Journal of cell science 121, 3778-3785
15. Azzouz M. (2006) *Gene Therapy for ALS: progress and prospects.* Biochimica et biophysica acta 1762, 1122-1127

16. Banci L. (2008) *SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization*. PloS one 3, e1677
17. Banerjee R. (2010) *Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications*. Trends in neurosciences 33, 541-549
18. Barbeito A. (2010) *Lead exposure stimulates VEGF expression in the spinal cord and extends survival in a mouse model of ALS*. Neurobiology of disease 37, 574-580
19. Barber SC. (2006) *Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target*. Biochimica et Biophysica Acta. 1762: 1051-1067
20. Barber SC. (2010) *Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target*. Free radical biology & medicine 48, 629-641
21. Beckman JS. (1993) *ALS, SOD and peroxynitrite*. Nature 364, 584
22. Beghi E. (2011) *The epidemiology and treatment of ALS: Focus on the heterogeneity of the disease and critical appraisal of therapeutic trials*. Amyotroph Lateral Scler 12(1): 1-10
23. Bendotti C. (2001) *Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels*. Journal of neurochemistry 79, 737-746
24. Bendotti C. (2001) *Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity*. J Neurol Sci. 191(1-2):25-33
25. Bendotti C. (2004) *Lessons from models of SOD1-linked familial ALS*. Trends in molecular medicine 10, 393-400
26. Bendotti C. (2009) *Amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and countermeasures*. Antioxid Redox Signal. 11(7):1519-22
27. Blokhuis AM. (2013) *Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis*. Acta neuropathologica 125, 777-794
28. Bogdanov M. (2000) *Increased oxidative damage to DNA in ALS patients*. Free radical biology & medicine 29, 652-658
29. Boillee S. (2006) *ALS: a disease of motor neurons and their non-neuronal neighbors*. Neuron.; 52, 39-59
30. Bonaldo P. (2013) *Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy*. Disease Models & Mechanisms 6, 25-39
31. Borchelt DR. (1998) *Axonal transport of mutant superoxide dismutase 1 and focal axonal abnormalities in the proximal axons of transgenic mice*. Neurobiology of disease 5, 27-35
32. Bosco DA. (2010) *Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules*. Human molecular genetics 19, 4160-4175
33. Bosco DA. (2010) *Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS*. Nature neuroscience 13, 1396-1403

34. Boylan K. (2015) *Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis*. *Neurol. Clin*; 33(4):807-30
35. Bradley J. (2008) *Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS*. *Progress in Neurobiology*. 85: 94- 134
36. Brooks BR. (1995) *Natural history of amyotrophic lateral sclerosis. Quantification of symptoms, signs, strength, and function*. *Advances in neurology* 68, 163-184
37. Brooks BR. (2000) *El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis*. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. (5):293-9
38. Brown RC. (2005) *Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors*. *Environ Health Perspect* 113:1250-1256
39. Bruijn LI. (1998) *Cleveland D.W. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1*. *Science*. 281:1851-1854
40. Bruijn LI. (2004) *Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS*. *Annu Rev Neurosci.*; 27:723-49
41. Buchan JR. (2009) *Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation*. *Molecular cell* 36, 932-941
42. Burns CJ. (2001) *Mortality in chemical workers potentially exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1945-94: an update*. *Occupational and environmental medicine* 58, 24-30
43. Casciati A. (2002) *Oxidative modulation of nuclear factor-kappaB in human cells expressing mutant fALS-typical superoxide dismutases*. *Journal of neurochemistry* 83, 1019-1029
44. Cashman NR. (1992) *Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons*. *Dev Dyn*. 194(3):209-21
45. Celardo I. (2011) *Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles*. *Nanoscale* 3,1-10
46. Chattopadhyay M. (2009) *Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS*. *Antioxid Redox Signal* 11, 1603-1614
47. Chen H. (2007) *Head injury and amyotrophic lateral sclerosis*. *American journal of epidemiology* 166, 810-816
48. Chen J. (2006) *Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides*. *Nat. Nanotech.*1, 142-150
49. Chen Y. (2012) *Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies*. *Neurotoxicology* 33, 391-400
50. Chen YZ. (2004) *DNA/RNA Helicase Gene Mutations in a Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS4)*. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 1128±1135

51. Chio A. (2009) *ALS in Italian professional soccer players: the risk is still present and could be soccer specific*. Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases 10, 205-209
52. Chiò A. (2009) *Prognostic factors in ALS: A critical review*. Amyotroph Lateral Scler 10(5-6): 310-323
53. Chou SM. (1996) *Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study*. Journal of chemical neuroanatomy 10, 249-258
54. Ciechanover A. (1998) *The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life*. The EMBO Journal Vol.17 No.24 pp.7151-7160
55. Ciechanover A. (2003) *The Ubiquitin Proteasome System in Neurodegenerative Diseases: Sometimes the Chicken, Sometimes the Egg*. Neuron ;40(2):427-46
56. Cirulli ET. (2015) *Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways*. Science. 347(6229):1436-41
57. Collard JF. (1995) *Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. Nature 375, 61-64
58. Corrado L. (2009) *High Frequency of TARDBP Gene Mutations in Italian Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Human Mutation Vol. 30 No. 4: 688±694
59. Cozzolino M. (2004) *Apoptosome inactivation rescues proneural and neural cells from neurodegeneration*. Cell death and differentiation 11, 1179-1191
60. Cozzolino M. (2008) *Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications*. Antioxid Redox Signal 10, 405-443
61. Cozzolino M. (2012) *Amyotrophic lateral sclerosis: new insights into underlying molecular mechanisms and opportunities for therapeutic intervention*. Antioxidants & redox signaling; 17, 1277-1330
62. Cox PA. (2002) *Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam*. Neurology 58, 956-959
63. Crosio C. (2006) *Bcl2a1 serves as a switch in death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis*. Cell death and differentiation 13, 2150-2153
64. Crosio C. (2011) *Astroglial inhibition of NF-kappaB does not ameliorate disease onset and progression in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. PloS one 6, e17187
65. Cudkovicz ME. (1997) *Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis*. Annals of neurology 41, 210-221
66. D'Ambrosi N. (2009) *The proinflammatory action of microglial P2 receptors is enhanced in SOD1 models for amyotrophic lateral sclerosis*. J Immunol 183, 4648-4656
67. Dahle JT. (2015) *Environmental geochemistry of cerium: applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles*. Int. J. Environ. Res. Public Health. 12(2), 1253-1278

68. Dan M. (2012) *Brain microvascular endothelial cell association and distribution of a 5 nm ceria engineered nanomaterial*. Int. J. Nanomed. 7, 4023–4036
69. Danielsson J. (2011) *Cutting off functional loops from homodimeric enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1) leaves monomeric β -barrels*. J Biol Chem;286(38):33070-83
70. Das M. (2007) *Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons*. Biomaterials. 28(10):1918-25
71. Davidson BL. (2003) *Viral vectors for gene delivery to the nervous system*. Nature reviews. Neuroscience 4, 353-364
72. De Vos KJ. (2012) *VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis*. Human Molecular Genetics, Vol. 21, No. 6 1299-1311
73. Deng HX. (1993) *Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu/Zn superoxide dismutase*. Science 261: 1047±1051
74. Di L. (2015) *Atypical familial amyotrophic lateral sclerosis with initial symptoms of pain or tremor in a Chinese family harboring VAPB-P56S mutation*. J Neurol.
75. Dianzani M. (2004). Istituzioni di Patologia Generale Utet
76. Diekstra FP. (2014) *C9orf72 and UNC13A are shared risk loci for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a genome-wide meta-analysis*. Ann Neurol. 76(1):120-33
77. Dion PA. (2009) *Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms*. Nature reviews. Genetics 10, 769-782
78. Doble A. (1996) *The pharmacology and mechanism of action of riluzole*. Neurology 47, S233-241
79. Dobson CM. (1999) *Protein misfolding, evolution and disease*. Trends Biochem Sci. 24(9):329-32
80. Dormann, D. (2010) *ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import*. The EMBO journal 29, 2841-2857
81. Dowding MJ. (2012) *Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical (NO)*. Chem Commun (Camb). 48(40): 4896-8
82. Dowding MJ. (2013) *Cerium oxide nanoparticles accelerate the decay of peroxynitrite (ONOO-)*. Drug Deliv. Transl. Res.3(4), 375–379
83. Doyle KM. (2011) *Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders*. J. Cell. Mol. Med. Vol 15, pp. 2025-2039
84. Dreyer J. (2011) *Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions*. Molecular biotechnology 47, 169-187
85. Duan W. (2010) *Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell*. Neuroscience 169, 1621-1629
86. Dunn WA. Jr. (1990) *Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole*. J Cell Biol.;110(6):1923-33

87. Durham HD. (1993) *Evaluation of the spinal cord neuron X neuroblastoma hybrid cell line NSC-34 as a model for neurotoxicity testing*. Neurotoxicology 14: 387±395
88. Durham HD. (1997) *Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS*. J Neuropathol Exp Neurol.: 56(5): 523-30
89. Ekester E. (2004) *Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis*. Neurodegenerative diseases 1, 88-100
90. Emerit J. (2004) *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Biomed. Pharmacother.58(1), 39-46
91. Epstein CJ. (1987) *Transgenic mice with increased Cu/Zn superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8044-8048
92. Esch F. (2005) *Electron localization determines defect formation on ceria substrates*. Science. 29;309 (5735):752-5
93. Estevez AG. (1999) *Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc deficient superoxide dismutase*. Science 286, 2498-2500
94. Estevez AY. (2014) *The potential of cerium oxide nanoparticles for neurodegenerative disease therapy*. Nanomedicine 9 (10), 1437-1440
95. Fasana E. (2010) *A VAPB mutant linked to amyotrophic lateral sclerosis generates a novel form of organized smooth endoplasmic reticulum*. FASEB journal 0892-6638/10/0024-1419
96. Ferri A. (2004) *Cell death in amyotrophic lateral sclerosis: interplay between neuronal and glial cells*. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 18, 1261-1263
97. Ferri A. (2006) *Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials*. Proc Natl Acad Sci U S A. 12;103(37):13860-5
98. Figlewicz DA. (1994) *Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis*. Human molecular genetics 3, 1757-176
99. Foran E. (2009) *Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis*. Antioxidants & redox signaling 11, 1587-1602
100. Frakes AE. (2014) *Microglia induce motor neuron death via the classical NF-κB pathway in amyotrophic lateral sclerosis*. Neuron. 81(5):1009-1023
101. Freedman MD. (2013) *Vitamin E serum levels and controlled supplementation and risk of amyotrophic lateral sclerosis*. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 14(4):246-51
102. Fujii R. (2005) *The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology*. Current biology: CB 15, 587-593
103. Funke AD. (2010) *The p. P56S mutation in the VAPB gene is not due to a single founder: the first European case*. Clin Genet: 77: 302-303

104. Gal J. (2007) *p62 accumulates and enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis*. The Journal of biological chemistry 282, 11068-11077
105. Gallo V. (2009) *Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort*. Ann Neurol 65, 378-385
106. ghr.nlm.nih.gov
107. Gkogka C. (2008) *VAPB interacts with and modulates the activity of ATF6*. Hum Mol Genet.; 1;17(11):1517-26
108. Glickman MH. (2002) *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev.;82(2):373-428
109. Goldberg GS. (1993) *Transfection of mammalian cells with PEG-purified plasmid DNA*. Biotechniques 14:548-550
110. Golomb BA. (2009) *Amyotrophic lateral sclerosis-like conditions in possible association with cholesterol-lowering drugs: an analysis of patient reports to the University of California, San Diego Statin Effects Study*. Drug Saf. 32, 649-661
111. Gonzalez-Scarano F. (1999) *Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases*. Annual review of neuroscience 22, 219-240
112. Gordon PH. (2008) A novel, efficient, randomized selection trial comparing combinations of drug therapy for ALS. Amyotroph Lateral Scler. 9(4):212-2
113. Graf M. (2005) *High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study*. J Neural Transm 112(5):649-60
114. Graham UM. (2014) *In vivo Processing of Ceria Nanoparticles inside Liver: Impact on Free-Radical Scavenging Activity and Oxidative Stress*. ChemPlusChem 79(8), 1083-108
115. Greenway MJ (2006) *ANG mutations segregate with familiar and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis*. Nat. Genet. 38: 411±3
116. Guareschi S. (2012). *An over-oxidized form of superoxide dismutase found in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with bulbar onset shares a toxic mechanism with mutant SOD1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 109, 5074-5079
117. Guégan C. (2001) *Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis*. J. Neurosci 21:6569-6576
118. Guégan C. (2002) *Instrumental activation of Bid by caspase-1 in a transgenic mouse model of ALS*. Mol. Cell. Neurosci 20:553-562
119. Guegan C. (2003) *Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis*. The Journal of clinical investigation 111, 153-161
120. Gurney ME. (1998) *Mutant CuZn superoxide dismutase in motor neuron disease*. J Inher Metab Dis. 21(5):587-97
121. Han J. (2016) *TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion*. [EMBO J.](#);35(2):121-42

122. Hayward C. (1998) *Homozygosity for Asn86Ser mutation in the Cu/Zn-superoxide dismutase gene produces a severe clinical phenotype in a juvenile onset case of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Journal of medical genetics 35, 174
123. Hegazy MA. (2017) *Cerium oxide nanoparticles could ameliorate behavioral and neurochemical impairments in 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease in rats*. Neurochem Int.108:361-371
124. Hensley K. (2002) *Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. Journal of neurochemistry 82, 365-374
125. Hodgson EK. (1975) *The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme*. Biochemistry. 14: 5294-5299
126. Hong K. (2012) *Full-length TDP-43 and its C-terminal fragments activate mitophagy in NSC34 cell line*. Neuroscience letters 530, 144-149
127. Hooten KG. (2015) *Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Neurotherapeutics 12(2):364-75
128. Hosseini A. (2013) *Anti-apoptotic effects of cerium oxide and yttrium oxide nanoparticles in isolated rat pancreatic islets*. Hum Exp Toxicol. 32(5):544-53
129. Howell N. (2005) *mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders*. Trends Genet 21:583-586
130. Howland DS. (2002) *Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 1604-1609
131. Huntemann M. (2013) *Genome sequence of the phylogenetically isolated spirochete Leptonema illini type strain (3055(T))*. Standards in genomic sciences 8, 177-187
132. Iaccarino C. (2011) *Bcl2-A1 interacts with pro-caspase-3: implications for amyotrophic lateral sclerosis*. Neurobiology of disease 43, 642-650
133. Ikeda K. (2010) *Study of 962 patients indicates progressive muscular atrophy is a form of ALS*. Neurology 74(23):1926
134. Jaarsma D. (2001) *Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations*. Acta neuropathologica 102, 293-305
135. Jara JH (2017) *Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS*. J. Neuroinflammation;14(1):129
136. Johnson JO. (2014) *Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Neurosci. 17(5):664-666
137. Johnson BS. (2009) *TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity*. The Journal of biological chemistry 284, 20329-20339

138. Kabashi E. (2008) *TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nature Genetics; Vol. 40 No. 5
139. Kabashi E. (2013) *Investigating the contribution of VAPB/ALS8 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis*. Hum Molecular Genetics Vol. 22, No. 12, 2350-2360
140. Kaltschmidt B. (2005) *Signaling via NF-kappaB in the nervous system*. Biochimica et biophysica acta 1745, 287-299
141. Kamel F. (2005) *Lead exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis*. Neurodegener Dis. 2, 195-201
142. Kanekura K. (2009) *ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis*. Mol Neurobiol. 39(2):81-9
143. Karch CM. (2009) *Role of mutant SOD1 disulfide oxidation and aggregation in the pathogenesis of familial ALS*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 7774-7779
144. Karumbayaram S. (2009) *Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons*. Stem Cells 27, 806-811
145. Kasarskis E. (2009) *Clinical aspects of ALS in Gulf War veterans*. Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases 10, 35-41
146. Khare SD. (2004) *The rate and equilibrium constants for a multistep reaction sequence for the aggregation of superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 15094-15099
147. Kim JY. (2016) *Neuronal overexpression of human VAPB slows motor impairment and neuromuscular denervation in a mouse model of ALS*. Human Molecular Genetics, Vol. 25, No. 21, 4661-4673
148. Kiriya Y. (2015) *The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases*. Int J Mol Sci.;16(11) 26797-26812
149. Komatsu M. (2005) *Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice*. The Journal of cell biology 169, 425-434
150. Kostic V. (1997) *Midbrain dopaminergic neuronal degeneration in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Annals of neurology 41, 497-504
151. Kostic V. (1997). *Bcl-2 prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Science 277:559-562
152. Kovacic P. (2012) *Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species*. Curr. Neuropharmacol.10(4), 289-302
153. Kruman II (1999) *ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis*. Experimental neurology 160, 28-39
154. Kuijpers M. (2013) *Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated VAPB-P56S inclusions represent an ER quality control compartment*. Acta Neuropathologica Communication, 1:24

155. Kumar A. (2014) *Behavior of nanoceria in biologically-relevant environments*. Environ. Sci. Nano1, 516 -532
156. Lagier-Tourenne C. (2010) *TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration*. Human molecular genetics 19, R46-64
157. Lagier-Tourenne C. (2012) *Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs*. Nature neuroscience 15, 1488-1497
158. Lev S. (2008) *The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease*. Trends Cell Biol.;18(6):282-90
159. Levine B. (2008) *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell 132, 27-42
160. Li L. (2008) *Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice*. Autophagy 4, 290-293
161. Li YR. (2013) *Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis*. The Journal of cell biology 201, 361-372
162. Lim ST. (2010) *Viral vectors for neurotrophic factor delivery: a gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS*. Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society 61, 14-26
163. Liu R. (2002) *Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival*. Journal of neurochemistry 80, 488-500
164. Liu-Yesucevitz L. (2010) *Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue*. PloS one 5, e13250
165. Luchinat E. (2014) *In-cell NMR reveals potential precursor of toxic species from SOD1 FALS mutants*. Nat Commun; 5:5502
166. Mackenzie IR. (2010) *TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia*. Lancet Neurol 9, 995-1007
167. Mahoney DJ. (2006) *Oxidative stress and antioxidant enzyme upregulation in SOD1-G93A mouse skeletal muscle*. Muscle Nerve.;33(6):809-16
168. Martin LJ. (1999) *Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism*. J Neuropathol Exp Neurol. 58(5):459-71
169. Mayeux R. (2003) *Epidemiology of neurodegeneration*. Annu Rev Neurosci 26:81-104
170. Mazzini L. (2003) *Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans*. Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders: official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases 4, 158-161
171. Mello C. (2004) *Revealing the world of RNA interference*. Nature 431, 338-342
172. Menzies FM. (2002) *Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Brain: a journal of neurology 125, 1522-1533

173. Merja J. (2014) *ER stress and unfolded protein response in amyotrophic lateral sclerosis-a controversial role of protein disulphide isomerase*. *Front. Cell. Neurosci.* 2; 8:402
174. Migliore L. (2009) *Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases*. *Mutation research* 667, 82-97
175. Miller RG. (2007) *Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)*. The Cochrane database of systematic reviews, CD001447
176. Mitsumoto H. (2014) *Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved?* *Lancet Neurol.* 13(11):1127-1138
177. Monaghan P. (1992) *Ultrastructural localization of bcl-2 protein*. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 40, 1819-1825
178. Mórotz GM. (2012) *Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant VAPBP56S perturbs calcium homeostasis to disrupt axonal transport of mitochondria*. *Hum Mol Genet.*;21(9):1979-88
179. Murakami T. (2001) *Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene*. *Neuroscience letters* 308, 149-152
180. Musaro A. (2013) *Understanding ALS: new therapeutic approaches*. *The FEBS journal* 280, 4315-4322
181. Nachreiner T. (2010) *Novel splice variants of the amyotrophic lateral sclerosis-associated gene VAPB expressed in human tissues*. *Biochem Biophys Res Commun.*;394(3):703-8
182. Nagase M. (2016) *Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration*. *Redox Rep.* 21(3):104-12
183. Nataraja J. (2017) *Nanoceria: a novel cytoprotective drug delivery carrier*. *Current Nanomedicine*, Volume 7, Issue 2, 6:111-106
184. Naz S. (2017) *Cerium oxide nanoparticles: a 'radical' approach to neurodegenerative disease treatment*. *Nanomedicine (Lond)* 12(5):545-553
185. Nazem A. (2008) *Nanotechnology solutions for Alzheimer's disease: advances in research tools, diagnostic methods and therapeutic agents*. *J. Alzheimer's Dis.*13(2), 199-223
186. Nedelsky NB. (2008) *Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection*. *BiochimBiophys Acta.*;1782(12):691-9
187. Neumann M. (2006) *Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis*. *Science* 314, 130-133
188. Ngo ST. (2015) *The interplay between metabolic homeostasis and neurodegeneration: insights into the neurometabolic nature of amyotrophic lateral sclerosis*. *Ngo and Steyn Cell Regeneration* 4:5
189. Niedzielska E. (2016) *Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases*. *Mol Neurobiol.* 53(6):4094-4125

190. Nishimura AL. (2004) *A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Am. J. Hum. Genet 75: 822±831
191. Nizzardo M. (2012) *Research advances in gene therapy approaches for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis*. Cellular and molecular life sciences: CMLS 69, 1641-1650
192. Orłowski RZ. (1999) *The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis*. Cell Death and Differentiation 6, 303-313
193. Oskarsson B. (2015) *Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Neurol Clin;33(4):877-88
194. Pan N. (2015) *On the origin of the oxidizing ability of ceria nanoparticles*. RSC Advances; Issue 118
195. Papadimitriou D. (2010) *Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil*. Neurobiology of disease 37, 493-502
196. Papiani G. (2012) *Restructured endoplasmic reticulum generated by mutant amyotrophic lateral sclerosis-linked VAPB is cleared by the proteasome*. Journal of Cell Science 125, 3601-3611
197. Pardo CA. (1995) *Cleveland D.W. Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 954-958
198. Parker SJ. (2012) *Endogenous TDP-43 localized to stress granules can subsequently form protein aggregates*. Neurochemistry international 60, 415-424
199. Pasinelli P. (1998) *Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 15763-1576
200. Pasinelli P. (2000) *Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 13901-13906
201. Pasinelli P. (2004) *Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria*. Neuron 43, 19-30
202. Pasinelli P. (2006) *Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics*. Nat Rev Neurosci. 7(9):710-23
203. Pasinetti GM. (2006) *Identification of potential CSF biomarkers in ALS*. Neurology vol.66 No. 8 1218-1222
204. Pinna A. (2012) *Release of ceria nanoparticles grafted on hybrid organic-inorganic films for biomedical application*. ACS Appl Mater Interfaces. 4(8):3916-22
205. Pinna A. (2013) *Combining top-down and bottom-up routes for fabrication of mesoporous titania films containing ceria nanoparticles for free radical scavenging*. ACS Appl Mater Interfaces. 5(8):3168-75

206. Polymenidou M. (2011) *Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43*. Nature neuroscience 14, 459-468
207. Pramatarova A. (2001) *Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase1 in transgenic mice does not lead to motor impairment*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 21, 3369-3374
208. Pugliatti M. (2013) *Amyotrophic lateral sclerosis in Sardinia, insular Italy, 1995-2009*. J Neurol. 260(2):572-9
209. Pulido-Reyes G. (2015) *Untangling the biological effects of cerium oxide nanoparticles: the role of surface valence states*. Sci. Rep.5, 15613
210. Puls I. (2003) *Mutant dynactin in motor neuron disease*. Nature genetics Vol. 33
211. Ramos J. (2005) *The TetR Family of Transcriptional Repressors, in Microbiol. Mol. Biol. Rev., vol. 69, n° 2, pp. 326-356*
212. Reaume AG. (1996) *Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury*. Nature genetics 13, 43-47
213. Reddy BM. (2005) *Nanosized CeO2-SiO2, CeO2-TiO2, CeO2-ZrO2 mixed oxides: influence of supporting oxide on thermal stability and oxygen storage properties of ceria*. Catal. Surv. Asia 9, 155-171
214. Renton AE. (2014) *State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics*. Nat Neurosci;17(1):17-23
215. Robberecht W. (2013) *The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Rev Neurosci. 14(4):248-64
216. Rosen DR. (1993) *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nature 362, 59-62
217. Rosenfield J. (1997) *Expression of superoxide dismutase following axotomy*. Exp. Neurol. 147: 37-47
218. Rothstein JD. (1992) *Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis*. The New England journal of medicine 326, 1464-1468
219. Rothstein JD. (1994) *Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 4155-4159
220. Rothstein JD. (2009) *Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol. 65 Suppl 1: S3-9
221. Rouaux C. (2007) *Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model*. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 27, 5535-5545
222. Rowland LP. (2001) *Amyotrophic lateral sclerosis*. N Engl J Med. 31;344(22):1688-700

223. Ryu H. (2005) *Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice*. Journal of neurochemistry 93, 1087-1098
224. Sanhueza M. (2015) *Network Analyses Reveal Novel Aspects of ALS Pathogenesis*. PLoS Genet 11(3): e1005107
225. Sasaki S. (1996) *Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis*. Neuroscience letters 204, 53-56
226. Sau D. (2007) *Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function*. Human molecular genetics 16, 1604-1618
227. Scarlatti F. (2009) *Does autophagy have a license to kill mammalian cells?* Cell death and differentiation 16, 12-20
228. Schmidt S. (2010) *Association of ALS with head injury, cigarette smoking and APOE genotypes*. Journal of the neurological sciences 291, 22-29
229. Schultz DR. (2003) *Apoptosis: programmed cell death at a molecular level*. Seminars in arthritis and rheumatism 32, 345-369
230. Sen I. (2005) *Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients preferentially elevates intracellular calcium and toxicity in motor neurons via AMPA/kainate receptor*. Journal of the neurological sciences 235, 45-54
231. Shaw PJ. (2005) *Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 76, 1046-1057
232. Shibata N. (1996) *Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55:481-490
233. Shibata N. (2001) *Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation*. Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology 21, 82-92
234. Silani V. (2010) *Stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: motor neuron protection or replacement?* CNS & neurological disorders drug targets 9, 314-324
235. Smith BM. (2014) *Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS*. Neuron. 22;84(2):324-31
236. Smith RA. (2006) *Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease*. The Journal of clinical investigation 116, 2290-2296
237. So Hui Kim (2009) *Structural Requirements for VAP-B Oligomerization and Their Implication in Amyotrophic Lateral Sclerosis-associated VAP-B(P56S) Neurotoxicity*. The journal of biological chemistry vol. 285, no. 18, pp. 13839-13849
238. Song J. (2013) *ALS-causing P56S mutation and splicing variation on the hVAPB MSP domain transform its β -sandwich fold into lipid-interacting helical conformations*. [Biochem Biophys Res Commun](#). 431(3):398-403
239. Soto C. (2003) *Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases*. Nature Reviews Neuroscience 4, 49-60

240. Spalloni A. (2004) *Cu/Zn-superoxide dismutase (GLY93-->ALA) mutation alters AMPA receptor subunit expression and function and potentiates kainate-mediated toxicity in motor neurons in culture*. *Neurobiology of disease* 15, 340-350
241. Stevanovic M. (2007) *Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 59(2):215-23
242. Sun Z. (2011) *Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS*. *PLoS biology* 9, e1000614
243. Sutedja NA. (2009) *Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review*. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 10, 302-309
244. Suzuki H. (2009) *ALS-linked P56S-VAPB, an aggregated loss-of-function mutant of VAPB, predisposes motor neurons to ER stress-related death by inducing aggregation of co-expressed wild-type VAPB*. *J Neurochem.*;108(4):973-985
245. Suzuki H. (2011) *TDP-43-induced death is associated with altered regulation of BIM and Bcl-xL and attenuated by caspase-mediated TDP-43 cleavage*. *J Biol Chem* 286, 13171-13183
246. Takeuchi H. (2002) *Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. *The Journal of biological chemistry* 277, 50966-50972
247. Tanaka M. (2002) *Pharmacological and clinical profile of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotective agent*. *Nihon Yakurigaku Zasshi*; 119(5):301-8
248. Tanida I. (2008) LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 445:77-88
249. Tarnuzzer RW. (2005) Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett.*5(12), 2573-2577
250. Teuling E. (2007) *Motor Neuron Disease-Associated Mutant Vesicle Associated Membrane Protein-Associated Protein (VAP)B Recruits Wild-Type VAPs into Endoplasmic Reticulum Derived Tubular Aggregates*. *The Journal of Neuroscience*, 27(36):9801-9815
251. Ticozzi N. (2011) *Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis*. *Archives italiennes de biologie* 149, 65-82
252. Tiwari A. (2005) *Mutant SOD1 instability: implications for toxicity in amyotrophic lateral sclerosis*. *Neuro-degenerative diseases* 2, 115-127
253. Tohgi H. (1999) *Increase in oxidized NO products and reduction in oxidized glutathione in cerebrospinal fluid from patients with sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis*. *Neuroscience letters* 260, 204-206
254. Trojsi F. (2013) *Exposure to environmental toxicants and pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: state of the art and research perspectives*. *International journal of molecular sciences* 14, 15286-15311

255. Troy CM. (1994) Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6384-6387
256. Tudor EL. (2010) Amyotrophic lateral sclerosis mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein-B transgenic mice develop TAR-DNA-binding protein-43 pathology. *Neuroscience*; 167(3):774-85
257. Turner BJ. (2008) Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Progress in neurobiology* 85, 94-134
258. Turner MR. (2013) Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet neurology* 12, 310-322
259. Uttara B. (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.*7(1), 65-74
260. Valentine JS. (1999) Copper-zinc superoxide dismutase and ALS. In: *Copper transport and its disorders*. Leone and Mercer Editors. 193-203. Plenum Publishers
261. Valentine JS. (2005) Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annual review of biochemistry* 74, 563-593
262. Van Den Bosch L. (2000) Different receptors mediate motor neuron death induced by short and long exposures to excitotoxicity. *Brain research bulletin* 53, 383-388
263. Vanacore N. (2010) Job strain, hypoxia and risk of amyotrophic lateral sclerosis: Results from a death certificate study. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 11, 430-434
264. Veldink JH. (2007) Intake of polyunsaturated fatty acids and vitamin E reduces the risk of developing amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 78(4):367-71
265. Vielhaber S. (2000) Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 123 (Pt 7):1339-48
266. Vukosavic S. (1999) Bax and Bcl-2 interaction in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 73(6):2460-8
267. Vukosavic S. (2000) Delaying caspase activation by Bcl-2: a clue to disease retardation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 20:9119-9125
268. Walkey C. (2015) Catalytic properties and biomedical applications of cerium oxide nanoparticles. *Environ. Sci. Nano*2(1), 33-53
269. Wang M. (2009) Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78= BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. *Antioxid Redox Signal.*;11(9):2307-16
270. Wei YH. (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.* 227: 671-682

271. Wicks P. (2007) Three soccer playing friends with simultaneous amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* 8, 177-179
272. Wiedau-Pazos M. (1996) Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 271, 515-518
273. Wiedemann FR. (1998) Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 156(1):65-72
274. Wiedemann FR. (2002) Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *Journal of neurochemistry* 80, 616-625
275. Wijesekera LC. (2009) Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4:3
- Worms PM. (2001) The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J. Neurol. Sci.* 191: 3-9
276. Wong E. (2010) Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience* 13, 805-811
277. Worms PM. (2001). The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J. Neurol. Sci.* 191, 3-9. 10.1016/S0022-510X(01)00630-X
278. Writing Group (2017) Safety and efficacy of edaravone in well-defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 16(7):505-512
279. Wu CH. (2012) Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 23;488(7412):499-503
280. www.aisla.it
281. www.aislasardegna.it
282. www.arisla.org
283. www.clinicaltrials.gov
284. Xing RH. (1996) Overexpression of urokinase receptor in breast cancer cells results in increased tumor invasion, growth and metastasis. *Int J Cancer* 67:423-429
285. Yamanaka K. (2005) Determinants of rapid disease progression in ALS. *Neurology* 65, 1859-1860
286. Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures; Tanpakushitsu kakusan koso. *Protein, nucleic acid, enzyme* 51, 2346-2351
287. Yang L. (2013) Intrinsically radiolabeled multifunctional cerium oxide nanoparticles for in vivo studies *Mater. Chem.* 1, 1421-1431
288. Yang Y. (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics* Vol. 29
289. Yim MB. (1990) Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 5006-5010

290. Yip PK. (2013) The omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid accelerates disease progression in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 19;8(4): e61626
291. Zhang X. (2011) Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 7, 412-425