



Sclerosi Laterale Amiotrofica: SOD1 è implicata nel danno cellulare anche nei casi sporadici

Simona Brajkovic, Silvia Rota, Mauro Ceroni, Emanuela Cova, Emanuela Leoni

*Reparto di Neurologia Generale, Università degli Studi di Pavia,
Fondazione IRCCS Casimiro Mondino, Pavia, Italia*

Sclerosi Laterale Amiotrofica: SOD1 è implicata nel danno cellulare anche nei casi sporadici

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia multifattoriale neurodegenerativa caratterizzata dalla perdita progressiva dei neuroni motori. Nel 20% dei casi la modalità di presentazione è familiare ed è stata correlata a specifici fattori genetici predisponenti. Nel 2% dei casi familiari di malattia sono state identificate mutazioni nel gene *sod1*, che determinerebbero l'acquisizione di proprietà tossiche da parte della proteina mutata. Alterazioni analoghe sono state evidenziate, mediante l'analisi di tessuti nervosi autoptici di pazienti sporadici, anche nella proteina wild-type (wt) sottoposta a danno ossidativo. I tessuti periferici, in particolare i linfociti, di pazienti affetti da SLA, si sono dimostrati modelli affidabili delle alterazioni fisiopatologiche della malattia, eliminando la variabilità dei dati dovuta alla degradazione post-mortem dei tessuti dei pazienti. Il nostro studio, mediante l'analisi dei linfociti periferici, ha permesso di evidenziare la presenza di proteina SOD1wt ossidata ed alterata anche nei pazienti con forma sporadica di malattia e di valutarne l'espressione nei diversi compartimenti cellulari. Dalla correlazione dei dati biologici con i parametri clinici è emerso come una diversa localizzazione intracellulare della proteina SOD1 possa influenzare la durata della patologia.

Amyotrophic Lateral Sclerosis: SOD1 is also involved in sporadic cases' cellular damage

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a multifactorial pathology characterized by a progressive loss of motor neurons. In 20% of cases the presentation is familiar and it is related to specific and predisposing genetic factors. Mutations in *sod1* gene have been identified in 2% of familiar cases which are likely to cause the mutated protein to gain toxic properties for cells. The analysis of post-mortem nervous tissues of sporadic ALS patients showed that oxidized SOD1 wild type (wt) protein has the same alterations as the mutated one. Sporadic ALS patients' peripheral tissues, especially lymphocytes, have been demonstrated as reliable models of pathophysiological alterations of the disease and their use leads to remove the variability of data due to post mortem degradation of the tissues. Our study, through peripheral lymphocytes' analysis, demonstrates the presence of misfolded and oxidized SOD1wt protein in sporadic ALS cases as well and examines its expression in cellular compartments. The correlation between biological data and clinical parameters shows how different SOD1 localizations could influence disease duration.

Introduzione

Sclerosi Laterale Amiotrofica

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia primitiva del Sistema Nervoso Centrale caratterizzata da una selettiva e progressiva degenerazione dei neuroni motori. È una malattia rara, con un'incidenza di 1.5-2.7 nuovi casi/anno ogni 100,000 abitanti [1] ed una prevalenza di 2.7-7.4 casi ogni 100,000 abitanti. L'età media d'esordio è 64 anni e la prognosi, inesorabilmente infausta, prevede una sopravvivenza media di 30 mesi [2-4]. La caratteristica clinica della SLA consiste nella contemporanea presenza di segni clinici di interessamento di primo e secondo motoneurone [5-6], sebbene la pratica clinica abbia fatto emergere l'esistenza di un'estesa eterogeneità di presentazione di malattia. Chiò et al., in seguito ad uno studio di popolazione, hanno individuato otto fenotipi clinici di SLA: classico, bulbare, flail arm, flail leg, piramidale, respiratorio, Pure Lower Motor Neuron (PLMN), Pure Upper Motor Neuron (PUMN) [7]. Il nostro studio ha previsto una suddivisione della nostra casistica di pazienti nei fenotipi clinici sopracitati. Inoltre, la somministrazione della ALS Functional Rating Scale-Revised (ALSFRS-R) [8] ai pazienti ci ha permesso di quantificarne la disabilità e valutarne la progressione della patologia. La forma sporadica di malattia (sSLA) comprende il 90-95% dei casi, mentre nel 5-10% dei casi la presentazione è familiare ed è correlata a specifici fattori genetici, acquisiti come caratteri autosomici dominanti. I loci genetici attualmente associati alla SLA sono 13 [9] e la loro individuazione ha reso possibile la creazione di modelli cellulari e murini transgenici, attraverso i quali vengono studiati i meccanismi sottesi alla malattia.

Nel 1993 sono state identificate le prime mutazioni del gene *sod1* in casi familiari di malattia [10]. Il gene *sod1*, situato sul cromosoma 21q22, codifica per il principale enzima antiossidante della cellula eucariota e permette la dismutazione dell'anione superossido (O_2^-) in ossigeno molecolare (O_2) e perossido di idrogeno (H_2O_2). La proteina SOD1 mutata risulta tossica per la cellula, non per la perdita della fisiologica funzione antiossidante, ma per l'acquisizione di proprietà tossiche [11]. In particolare, la SOD1 mutata acquisirebbe una forte instabilità strutturale con conseguente interazione con substrati non convenzionali o impropri e formazione di radicali liberi in eccesso, e/o andrebbe incontro ad un errato misfolding con successiva aggregazione all'interno del citoplasma cellulare [12-13]. Studi recenti hanno dimostrato la presenza di aggregati di SOD1 wild type (SOD1wt) anche a livello di tessuti nervosi autoptici di pazienti affetti dalla forma sporadica di malattia [14]. La SOD1wt, infatti, sottoposta a danno da stress ossidativo, tenderebbe ad acquisire le medesime proprietà nocive della proteina mutata [15]. Tali dati portano, quindi, ad ipotizzare una comune via patogenetica SOD1-mediata delle due forme, familiare e sporadica, di malattia. Un ulteriore supporto a tali considerazioni deriva dall'evidenza di come le due forme di SLA siano clinicamente indistinguibili [16-17].

Altri fattori concorrono al danno cellulare nella patogenesi della malattia: un aumento dello stress ossidativo e un'aumentata sensibilità a tale insulto nei pazienti rispetto ai controlli sani [18-20], la presenza di aggregati citoplasmatici che determinerebbero un probabile sequestro di molecole cruciali per la cellula [21], disfunzione dei mitocondri [22], eccitotossicità da alterata espressione di trasportatori del glutammato [23], alterazioni del trasporto assonale [24], deficit di fattori neurotrofici [25] ed alterazioni infiammatorie [26]. Ad oggi la diagnosi di SLA è clinica, dal momento che non sono noti biomarcatori di malattia, e l'unica terapia approvata dalla FDA è il riluzolo, che determina un aumento della sopravvivenza media di circa tre mesi [27].

Utilizzo dei tessuti periferici nello studio della SLA

Lo studio dei meccanismi eziopatogenetici sottesi alla forma sporadica di SLA è stata possibile, per anni, soltanto mediante l'analisi dei tessuti nervosi di derivazione autoptica, dal momento che non è possibile ottenere modelli né cellulari né murini. I dati conseguiti risultavano, però, di difficile interpretazione per la possibile influenza dei processi di degradazione organica post-mortem.

Studi recenti hanno dimostrato come le cellule di derivazione periferica, in particolare i linfociti, siano modelli attendibili delle alterazioni fisiopatologiche della malattia [19-20, 28], permettendo l'analisi delle alterazioni cellulari nella sSLA in vivo e su tessuti ottenibili con metodiche semplici, di facile esecuzione, poco invasive e facili da processare e catalogare.

La presenza di anomalie cellulari analoghe nei motoneuroni e nei linfociti definisce la natura sistemica della SLA, nonostante le manifestazioni cliniche siano quasi esclusivamente neurologiche. Inoltre, la facile reperibilità dei linfociti permette di ottenere più campioni a distanza di mesi, così da valutare il correlato biologico della progressione clinica della malattia. In un futuro l'analisi delle alterazioni a carico delle cellule periferiche potrà permettere l'individuazione di biomarcatori di malattia.

Scopo del lavoro

Le forme sporadiche e familiari di SLA sono clinicamente indistinguibili [16,17].

Studi recenti hanno dimostrato la presenza di SOD1wt misfoldata ed aggregata, con caratteristiche analoghe alla proteina mutata, in tessuti nervosi autoptici di un sottogruppo di casi sporadici di malattia [14]. Nei linfociti periferici di pazienti sporadici è stata documentata un'alterata espressione del mRNA, aumentato, e della proteina SOD1, ridotta, che evidenzia ulteriormente il coinvolgimento di SOD1 nella genesi della forma sporadica di malattia [29]. Tali dati sono fortemente suggestivi di una via patogenetica comune SOD1-mediata nella SLA familiare e sporadica.

Il nostro studio si propone di:

- valutare la presenza di SOD1wt alterata, già documentata nei tessuti nervosi autoptici di casi sporadici di malattia, anche nei linfociti periferici di pazienti sSLA.
 - Discriminare l'espressione di SOD1 a livello intracellulare: nucleo e citoplasma.
 - Valutare la presenza di SOD1wt aggregata nel pellet insolubile.
- Individuare un possibile biomcatore di malattia.
- Derivare approcci terapeutici nuovi e mirati.

Materiali e metodi

Reclutamento dei pazienti

Il nostro studio ha previsto, previa acquisizione del consenso informato, l'isolamento di cellule mononucleate (PBMCs), di cui i linfociti rappresentano la quota prevalente, da campioni di sangue venoso di 19 pazienti affetti da SLA sporadica. La diagnosi è stata effettuata presso l'Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino di Pavia in base ai criteri El Escorial revisionati. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella figura 1. Il confronto è stato effettuato con 17 volontari sani, con analoghi requisiti di età e sesso e non sottoposti ad alcuna terapia farmacologica, e 7 controlli neurologici affetti da malattia di Alzheimer (AD), diagnosticata presso l'Istituto Neurologico Nazionale Casimiro Mondino di Pavia.

Isolamento dei linfociti e frazionamento subcellulare

I campioni ematici sono stati raccolti in provette contenenti anticoagulante EDTA e, successivamente, processati riducendo al minimo il tempo tra il campionamento e l'isolamento cellulare. In seguito a diluizione 1:2 con soluzione Ficoll Histopaque®-1077 per 30 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 2,300 rpm, a temperatura ambiente, per ulteriori 30 minuti. Le PBMCs recuperate dall'interfaccia plasma-Ficoll sono state diluite in soluzione salina tampone di fosfato (PBS) e ri-centrifugate due volte a 1,200 g a temperatura ambiente. Si è, quindi, valutata la vitalità cellulare. Mediante l'impiego di tampone ipotonico (1% Chaps, 14.5 mM KCl, 5 mM MgCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA e 20 mM Tris/HCl) è stato estratto il contenuto proteico totale dalle PBMCs; sono state, quindi, separate le componenti solubili citoplasmatica e nucleare. La frazione insolubile è stata risospesa in tampone di lisi così da dissociare gli eventuali aggregati proteici (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% di inibitori delle proteasi, 40 mM NaF and 1 mM Na₃VO₄). Dopo la determinazione del contenuto proteico e l'analisi delle frazioni di ciascun estratto, si è proceduto al congelamento a -80°.

Elettroforesi e Western Blotting (WB)

Per ciascun campione sono stati caricati 25 µg di proteine su gel di poliacrilammide contenente il 12.5% di Sodio-Dodecil-Solfato (SDS-PAGE) ed è stata avviata una corsa elettroforetica al voltaggio di 120 volt. Le proteine separate sono state, quindi, trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Trans-blot, Laboratori BioRad, Italia) utilizzando un apparato di trasferimento liquido e impostando un amperaggio costante di 350 mA. Una volta terminato il blotting le membrane sono state colorate con rosso ponceau al fine di verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine ed, in seguito, bloccate in soluzione salina tamponata Tris Tween-20 (TBS-T) con 5% di latte per 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state, quindi, incubate overnight con l'anticorpo primario anti-SOD1 policlonale di coniglio (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA; diluizione 1:1000 nella soluzione bloccante). L'immunoreattività è stata rilevata tramite l'uso di anticorpi secondari anti-coniglio coniugati con perossidasi di rafano (GE Healthcare, UK; diluizione 1:10,000) e le bande sono state visualizzate tramite chemiluminescenza mediante il kit ECL Advance (GeHealthcare, UK). Per le successive immunoreazioni, gli anticorpi primari e secondari sono stati rimossi dalla membrana mediante l'impiego di una soluzione contenente Mercaptoetanolo, 2% di SDS, e 62.5 mM Tris/HCl, pH 6.7 per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo una serie di lavaggi in TBS-T, le membrane sono state processate come descritto sopra. Per normalizzare il contenuto proteico totale, citoplasmatico, nucleare e della frazione citoplasmatica insolubile, le membrane sono state incubate con anticorpi anti-catalasi (GeneTex, Inc., CA, USA, diluizione 1:1000), anti-LDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA; 1:1000), anti-PCNA (Calbiochem, 1:1000) e anti-β tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA; 1:250), rispettivamente. Le analisi densitometriche delle rispettive bande sono state effettuate mediante l'utilizzo del software Quantity One (BioRad, Italia).

Determinazione dei ROS e dei livelli di apoptosi precoce nei linfociti

Per ogni paziente/controllo è stata preparata una serie di tre provette, ciascuna contenente 5×10^5 cellule risospese in 50 µL di terreno liquido RPMI-1640. Per determinare i ROS, ai campioni sono stati aggiunti 3 µL di una soluzione standard di 1,2,3 dihydorrodamine (DHR, Invitrogen, Milano, Italia), ottenuta risospesando 10 mg di DHR in 1 ml di Dimetilsolfossido (35 mmol/L), e 0.9 ml di PBS (riscaldato a 37°C). I preparati sono stati lasciati al buio, a temperatura ambiente, per 20 minuti, quindi, dopo due lavaggi in PBS, il pellet è stato risospeso in 1.5 ml di PBS e analizzato mediante citometria a flusso (vedi sotto). Per valutare i livelli di apoptosi precoce, le cellule sono state centrifugate e, rimosso il PBS, il pellet è stato risospeso in 2 ml di tampone di legame (kit Invitrogen, Milano, Italia). Il campione, mantenuto al buio a temperatura ambiente per 5 mi-

nuti, è stato risospeso in 3 μ L di soluzione di annessina/isotiocianato di fluoresceina. Dopo l'aggiunta di 5 μ L di propidio ioduro (PI) diluito, il preparato è stato lasciato al buio a temperatura ambiente per altri 10 minuti e, infine, analizzato mediante citometria a flusso.

Citometria a flusso

Le misurazioni sono state effettuate mediante citometro a flusso Partec PAS II (Munster, Germania) fornito di un doppio sistema di eccitazione (laser a ioni Argon e lampada ad arco HBO 100-W). È stato utilizzato il laser blu a 488 nm per l'eccitazione della DHR (analisi dei ROS) come della FITC/PI (determinazione dell'apoptosi), mentre per l'eccitazione del Propidio Ioduro (HO33342/PI) sono stati utilizzati raggi UV a 366 nm originati da lampada a mercurio. Per garantire il massimo rendimento dello strumento, si è sempre effettuato un preliminare allineamento e controllo con timociti di ratto colorati di PI. Appena prima della misurazione, ogni campione è stato filtrato con Filcons 100 (CONSULTS, Torino, Italia), al fine di rimuovere eventuali clusters di cellule. Per la misurazione di un campione sono stati acquisiti un minimo di 20,000 eventi. I dati sono visualizzati mediante un istogramma a fluorescenza dei segnali FL1 (segnali fluorescenti verdi monometrici) (campioni DHR) o mediante dot plots che correlano l'emissione di doppia fluorescenza verde-rossa FL1/FL3 nel caso dei campioni con Annessina V. Un convertitore digitale ha permesso il trasferimento dei dati sul PC installato sul citofluorimetro, il cui specifico software Flow max è specializzato nella determinazione quantitativa delle sottopopolazioni delle cellule di interesse.

Analisi statistica

Per la valutazione di differenze significative tra i parametri clinici e biochimici dei pazienti rispetto ai controlli (neurologici e non) è stato utilizzato il t-test di Student. L'analisi di regressione standard ha permesso la correlazione tra le caratteristiche cliniche dei pazienti e l'espressione nucleare di SOD1. Un valore di $p > 0.05$ è considerato statisticamente significativo.

Risultati

Soggetti reclutati per lo studio

Sono stati reclutati 19 pazienti affetti da forma sporadica di SLA e, successivamente, catalogati in base alla nuova classificazione fenotipica (Figura 1).

Il confronto è stato effettuato con 17 controlli sani e 7 pazienti affetti da malattia di Alzheimer. I gruppi di controllo non stati confrontati in quanto appartenenti a fasce d'età differenti.

Espressione nucleare e citoplasmatica della proteina SOD1wt nei linfociti periferici di sSLA

La quantità di proteina SOD1wt nucleare, valutata tramite tecnica di Western Blot, è stata espressa relativamente ad un'altra proteina nucleare costitutiva, detta PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), per evitare i possibili errori di caricamento delle proteine in elettroforesi.

Parimenti, la quantità di proteina SOD1wt citoplasmatica è stata espressa in rapporto alla proteina citoplasmatica costitutiva LDH (Lattato Deidrogenasi).

In figura 2 è riportata un'immagine rappresentativa di Western Blot.

L'espressione nucleare media della proteina SOD1wt è maggiore nei pazienti rispetto ai controlli, neurologici e non. In particolare sono stati individuati due gruppi di pazienti (Figura 3): il primo con livelli di proteina SOD1wt nucleare analoghi ai controlli, il secondo con livelli significativamente superiori ai controlli, indipendentemente dalla presenza di un paziente (SLA 11/06), la cui quota nucleare di

proteina faceva, in un primo momento, sopporre un'influenza tale sulla statistica da renderla significativa solo per la sua presenza. L'eliminazione del paziente non ha modificato la significatività del dato. L'espressione citoplasmatica della proteina SOD1wt, riferita alla quota presente nella frazione solubile, non mostra differenze significative tra pazienti e controlli.

Espressione totale della proteina SOD1 mediante analisi con citometria a flusso

L'analisi mediante citometria a flusso permette di quantificare l'espressione della proteina nella cellula intera, evitando l'estrazione che porta alla perdita della parte insolubile della proteina. Dalla Figura 4 si evince come le cellule dei pazienti esprimano, mediamente, il 10-15% in più di SOD1wt rispetto ai controlli: tale dato è statisticamente significativo.

Estrazione del pellet contenente la frazione insolubile delle proteine

La frazione insolubile (pellet) di proteine cellulari è stata risospesa in soluzione di tampone di lisi, così da dissociare le eventuali proteine precipitate. La quantità di proteina SOD1wt è stata espressa relativamente alla proteina β -tubulina, legata alla frazione citoscheletrica insolubile.

Tale metodica ha permesso di rilevare, soprattutto nel gruppo di pazienti con espressione di SOD1wt nucleare analoga ai controlli, una abbondante presenza di aggregati proteici di SOD1wt, assenti nei controlli. Tale dato è ancora più evidente nei pannelli di WB dopo lunga esposizione (Figura 5).

Stress ossidativo e tasso di apoptosi precoce nei linfociti dei pazienti sSLA

Il dosaggio dell'enzima di sintesi mitocondriale DHR (1,2,3 dihydrrhodamine) permette la quantificazione della produzione di radicali liberi dai mitocondri. Tale metodica ha confermato la presenza di un significativo aumento dello stress ossidativo nei pazienti rispetto ai controlli.

Il dosaggio dell'annessina intracellulare, nota proteina pro-apoptotica, ha permesso di confermare un aumento della quota di cellule in apoptosi precoce nei casi rispetto ai controlli.

Correlazione espressione e distribuzione SOD1 con il parametro clinico di durata di malattia

In base alla distribuzione subcellulare della proteina SOD1wt, i casi sSLA da noi reclutati sono divisibili in due gruppi:

- pazienti con maggiori livelli di aggregati citoplasmatici nel pellet insolubile, ma minor quota di SOD1wt nucleare;
- pazienti con scarsi aggregati citoplasmatici, ma livelli più elevati di proteina nucleare.

Si è, quindi, proceduto alla correlazione tra l'espressione nucleare di SOD1wt ed il parametro clinico di durata di malattia, espresso in mesi. Dall'analisi statistica effettuata (Figura 6) emerge come i pazienti con incrementati livelli di SOD1 nel nucleo abbiano una maggiore durata di malattia; in particolare tanto più elevati sono i livelli nucleari tanto maggiore è la durata di malattia. Il paziente SLA 11/06 che mostra una quota nucleare di proteina nettamente superiore non solo ai controlli, ma anche ai pazienti appartenenti al suo stesso gruppo, presenta anche la maggior durata di malattia: 147 mesi.

Discussione

Dai dati ottenuti dal nostro studio emergono numerose ipotesi circa i meccanismi alla base del coinvolgimento della SOD1wt nella patogenesi della forma sporadica di SLA.

Studi recenti [14] hanno dimostrato la presenza di aggregati di SOD1wt ossidata e misfoldata all'interno dei motoneuroni di pazienti affetti da sSLA, mediante l'analisi dei tessuti autoptici. Tale dato, importante premessa per il nostro lavoro, ha confermato, nei casi sporadici, l'acquisizione da parte della proteina SOD1wt ossidata di proprietà tossiche analoghe alla proteina mutata [15]. È noto che, nei casi familiari di SLA, la proteina SOD1 viene espressa in forma mutata e tale mutazione non determina, come si ipotizzava inizialmente, una perdita di funzione della molecola, bensì l'acquisizione di caratteristiche altamente nocive per la cellula [11]. In particolare, la SOD1 mutata interagirebbe con substrati alterati e/o andrebbe incontro a misfolding aggregandosi nel citoplasma cellulare [12-13].

La caratteristica innovativa del nostro studio consiste nell'identificazione delle alterazioni della SOD1wt anche nei tessuti periferici di un sottogruppo di casi sporadici di malattia. Si deduce, quindi, che il meccanismo eziopatogenetico SOD1-mediato riveste un ruolo rilevante nella storia della malattia, in quanto la proteina in forma aberrante è espressa a livello sistemico, in particolare in cellule molto distanti dai tessuti primitivamente colpiti. Mediante il dosaggio dell'enzima di sintesi mitocondriale DHR, ci è stato possibile confermare, come già evidenziato in nostri studi precedenti [20], che, nei linfociti dei pazienti, rispetto ai controlli, è presente un incremento dello stress ossidativo. È da chiarire se il danno ossidativo rappresenti il inducente l'aberrante conformazione e l'aggregazione della SOD1 o se, al contrario, sia l'effetto di modificazioni post-traduzionali e dell'acquisizione di proprietà tossiche della proteina.

Un dato di notevole interesse è rappresentato dalla distribuzione della proteina SOD1wt nei compartimenti intracellulari, in particolare l'espressione nucleare della proteina stessa. Quest'ultima caratteristica permette l'identificazione di due gruppi di pazienti: il primo che esprime livelli di SOD1 nucleare nettamente maggiori rispetto ai controlli, il secondo con quota di SOD1 nel nucleo analoga ai controlli. Dalla correlazione tra la quota di SOD1 nel nucleo ed il parametro clinico di durata di malattia emerge come maggiore è la quantità di proteina evidenziabile nel nucleo maggiore è la durata di malattia. La presenza del paziente SLA 11/06, i cui livelli di SOD1 nucleare sono i più alti di tutti i casi esaminati, non ha, però, influenzato la statistica tanto da renderla significativa solo per la sua presenza. I dati si sono dimostrati significativi anche in assenza di esso.

Tali risultati ci portano ad ipotizzare che una maggiore quota di SOD1 nucleare rappresenti un fattore protettivo o di rallentamento della progressione della patologia. Tuttavia non possiamo escludere che l'aumento della SOD1 nucleare rappresenti unicamente un indicatore di progressione di malattia. Uno stretto follow-up dei pazienti da noi reclutati ci permetterà di discriminare tra queste due ipotesi; in ogni caso la nostra osservazione apre nuove prospettive sul ruolo della SOD1, finora studiata solo nella sua funzione citoplasmatica, mitocondriale ed, in parte, a livello del reticolo endoplasmatico. Per una più accurata definizione del ruolo di SOD1 a livello nucleare, nel nostro laboratorio, sono in corso esperimenti finalizzati ad individuare se la proteina, in tale sede, funge, ad esempio, da fattore di trascrizione di specifici geni in determinate condizioni (aumentato stress ossidativo), come già dimostrato in un modello di cellule tumorali [30]. Nel caso si confermasse un'attività della proteina in questo senso, le indagini andrebbero approfondite ed ampliate in vista di eventuali implicazioni terapeutiche.

La quota citoplasmatica di SOD1wt non sembra differire tra pazienti e controlli, ma sembrerebbe esistere una correlazione inversa tra i livelli citoplasmatici e nucleari di proteina. Infatti, soprattutto nei pazienti con livelli nucleari di SOD1 poco dissimili dai controlli, si è evidenziata una maggior quantità di SOD1 aggregata. Dal momento che la proteina SOD1, a causa del basso peso molecolare, rientra nel gruppo di proteine in grado di attraversare la parete nucleare mediante i pori, senza necessità di carriers, si potrebbe

ipotizzare che l'aggregazione in complessi ad alto peso molecolare ne impedisca il trasferimento nel nucleo. In questo caso, se la quota nucleare di SOD1 risultasse un fattore protettivo, la quota citoplasmatica sarebbe un fattore tossico e correlerebbe sfavorevolmente con il decorso della malattia.

Il nostro studio ha, inoltre, permesso di giustificare il precedente dato di dissociazione tra l'aumentata espressione di mRNA e la ridotta espressione di proteina SOD1 nei linfociti periferici di sSLA [29]. L'analisi mediante citometria a flusso ha dimostrato nei pazienti un aumento del 10-15% nell'espressione della proteina nella cellula intera rispetto ai controlli e tale dato tiene conto di entrambe le frazioni proteiche, sia solubili (estraibili con le comuni metodiche) sia insolubili (precipitate nel pellet). Inoltre, non era stato possibile quantificare la quota nucleare di proteina, che era andata perduta. Le metodiche da noi utilizzate in questo lavoro hanno permesso la valutazione sia della quota nucleare sia della quota aggregata e precipitata nel pellet insolubile della proteina SOD1. In particolare, il riscontro di diverse quantità di proteina aggregata nel pellet insolubile nei diversi pazienti ci porta a supporre che tale dato sia dovuto ad una diversa risposta al misfolding proteico con conseguente differente espressione del fenotipo clinico.

In conclusione, il nostro lavoro riafferma l'affidabilità del linfocita periferico come modello delle alterazioni fisiopatologiche della malattia. Il riscontro, in esso, di alterazioni della proteina SOD1wt analoghe a quelle evidenziate nei tessuti nervosi autoptici di pazienti affetti, impone di considerarne il futuro utilizzo per l'identificazione di possibili biomarcatori. Infine l'ampliamento del campione ci permetterà di correlare anche i fenotipi clinici di malattia con i diversi pattern di distribuzione subcellulare di SOD1, derivandone nuovi approcci terapeutici.

Tabelle e figure

Casi ID	Sesso	Età all'esordio (anni)	Durata malattia (mesi)	Commenti	Fenotipo clinico		Terapia (Riluzolo)
					Esordio	Evoluzione	
SLA 14/10	M	53	18		CLASSICA	CLASSICA	SI
SLA 03/09	F	54	36		CLASSICA	CLASSICA	SI
SLA 22/10	F	55	15		CLASSICA	CLASSICA	NO
SLA 16/10	F	45	30		CLASSICA	CLASSICA	NO
SLA 17/10	F	62	23		CLASSICA	CLASSICA	SI
SLA 29/10	M	56	17		BULBARE	BULBARE	SI
SLA 15/10	M	77	10		BULBARE	CLASSICA	NO
SLA 24/10	F	59	41		BULBARE	PLMN + FTD	SI
SLA 20/10	M	73	17	deceduto	BULBARE	CLASSICA	NO
SLA 28/10	F	62	8		BULBARE	PLMN	SI
SLA 09/11	M	67	8		BULBARE	CLASSICA	SI
SLA 27/10	F	57	31		PLMN	PLMN	NO
SLA 01/10	M	63	19		PLMN	PLMN	NO
SLA 08/11	M	64	60	deceduto	PLMN	PLMN +FTD	SI
SLA 03/07	M	72	108		FLAIL ARM	PLMN	SI
SLA 07/11	M	55	50		FLAIL LEG	PLMN	SI
SLA 11/06	M	27	147		FLAIL LEG	PLMN	SI
SLA 03/11	M	38	62		PIRAMIDALE	PIRAMIDALE	SI
SLA 05/07	F	50	54	TDP43 mutata	PUMN	PUMN	SI

Figura 1. Tabella riassuntiva dei pazienti reclutati per lo studio catalogati in base alla nuova classificazione dei fenotipi clinici di malattia.

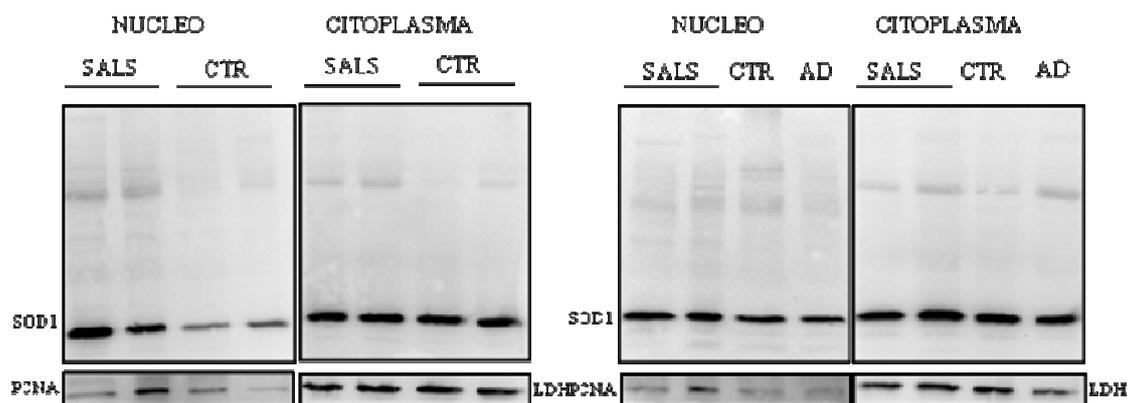


Figura 2. Immagini rappresentative di Western Blot: ciascuna costituita da due pannelli rappresentanti rispettivamente l'espressione nucleare e citoplasmatica della proteina SOD1 nei pazienti e nei controlli, neurologici e non.

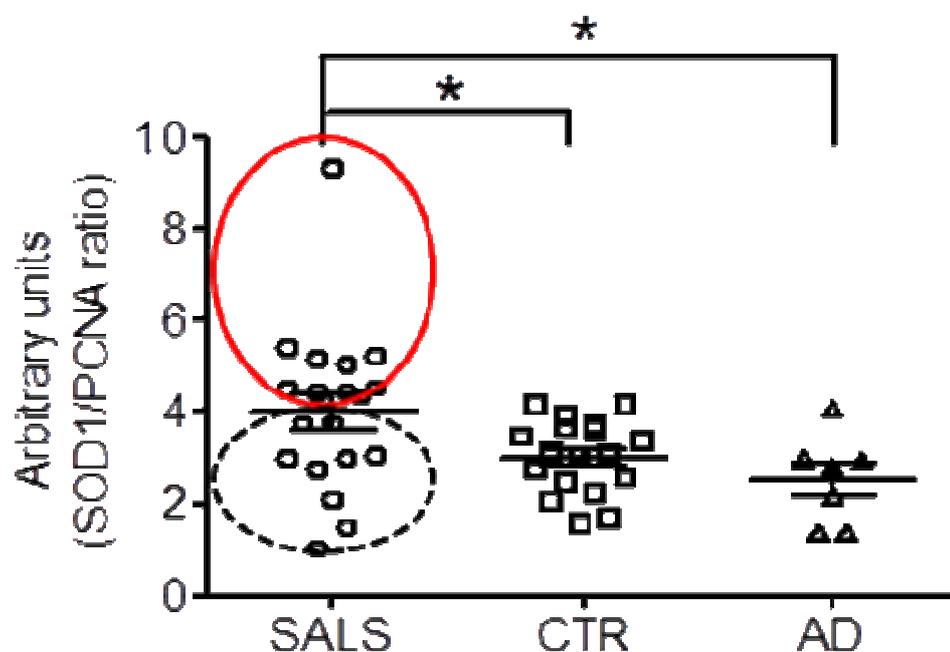


Figura 3. Espressione nucleare di SOD1. Sono identificabili due gruppi di pazienti: un gruppo con livelli di SOD1 analoghi ai controlli, un gruppo con quota nucleare di proteina superiore ai controlli.

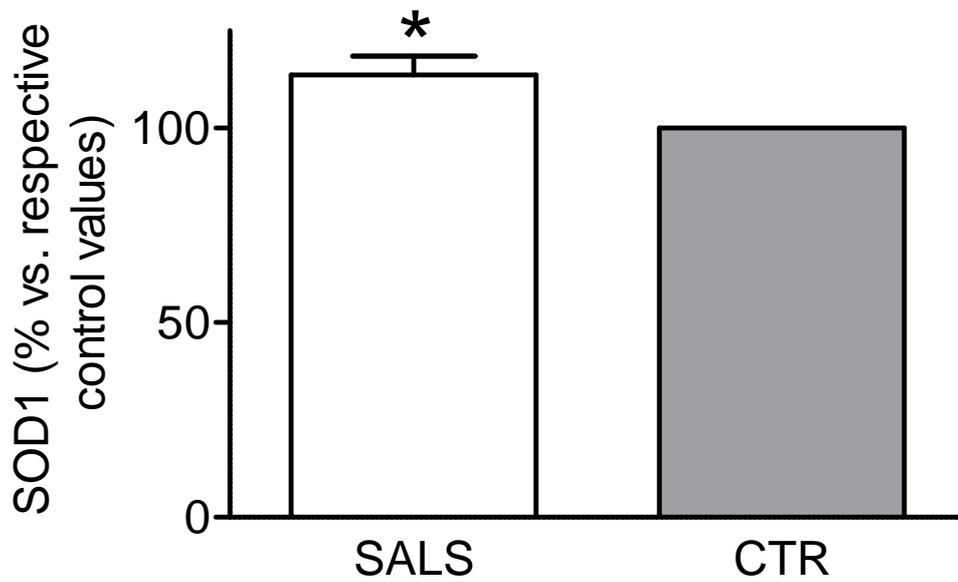


Figura 4. Espressione totale di SOD1 nella cellula intera mediante citometria a flusso.

Pellet SOD1

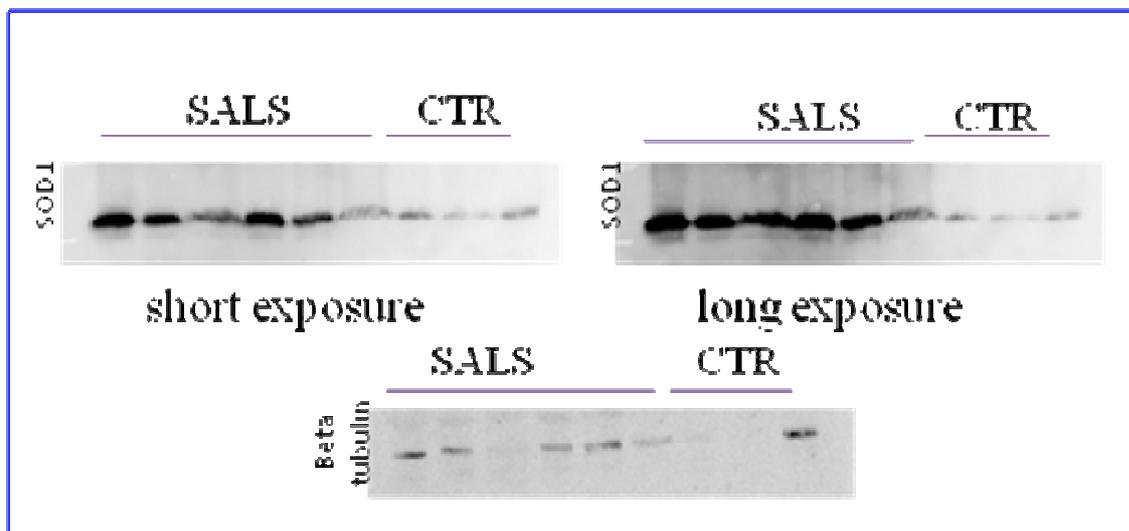


Figura 5. Quantificazione della proteina SOD1 precipitata nel pellet (frazione insolubile) mediante Western Blot.

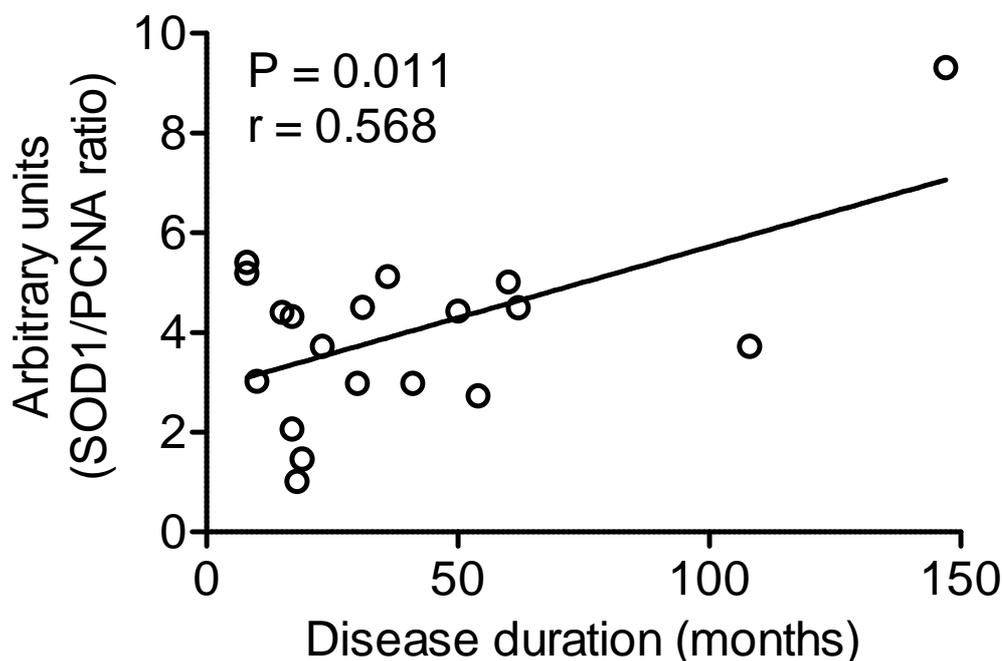


Figura 6. Correlazione tra l'espressione nucleare di SOD1 e la durata di malattia.

Bibliografia

1. Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *Journal of the Neurological Sciences* 2001;191:3-9.
2. Tysnes OB, Vollset SE, Aarli JA. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Hordaland county, western Norway. *Acta Neurol Scand* 1991;83:280-285.
3. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2001;344(2):1688-1700.
4. Forsgren L, Almay BGL, Holmgren G et al. Epidemiology of motor neuron disease in northern Sweden. *Acta Neurol Scand* 1983;68:20-29.
5. Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurol Pathol* 1869;2:744-760.
6. Loeb C, Caponnetto C. Malattie primitive del motoneurone. In: Neurologia di Fazio Loeb. Roma Società Editrice Universo, Roma, IT, 2003.
7. Chiò A, Calvo A, Moglia C et al. PARALS study group. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82(7):740-746.
8. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci* 1999;169(1-2):13-21.
9. Valdmanis PN, Rouleau GA. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2008;70:144-152.
10. Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
11. Gurney ME, Pu H, Chiu AY et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264:1772-1775.
12. Beckman JS, Carson M, Smith CD et al. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 1993;364:584.
13. Estévez AG, Crow JP, Sampson JB et al. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* 1999;286:2498-500.
14. Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM et al. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci* 2010;13(11):1396-1403.
15. Rakhit R, Cunningham P, Furtos-Matei A et al. Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2002;277:47551-47556.

16. Li TM, Alberman E, Swash MJ. Comparison of sporadic and familial disease amongst 850 cases of motor neurone disease. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:778-784.
17. Williams DB. Familial amyotrophic lateral sclerosis. In: Handbook of clinical neurology. Elsevier, Amsterdam, NL, 1991.
18. Simpson EP, Yen AA, Appel SH. Oxidative Stress: a common denominator in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*, 2003;15:730-736.
19. Cova E, Cereda C, Galli A et al. Modified expression of Bcl-2 and SOD1 proteins in lymphocytes from sporadic ALS patients. *Neurosci Lett* 2006;399(3):186-190.
20. Cova E, Bongioanni P, Cereda C et al. Time course of oxidant markers and antioxidant defenses in subgroups of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurochem Int* 2010;56(5):687-693.
21. Cozzolino M, Ferri A, Carri' MT. Amyotrophic Lateral Sclerosis: From Current Developments in the Laboratory to Clinical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 2008;10:406-430.
22. Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 2005;58:495-505.
23. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1990;28:18-25.
24. De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S et al. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Annu Rev Neurosci* 2008;151-173.
25. Oppenheim RW. Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron* 1996;17:195-197.
26. McCombe PA, Henderson RD. The Role of immune and inflammatory mechanisms in ALS. *Curr Mol Med* 2011;11(3):246-254.
27. Doble A. The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 1996;47(suppl. 4):S233-S241.
28. Curti D, Malaspina A, Facchetti G et al. Amyotrophic lateral sclerosis: oxidative energy metabolism and calcium homeostasis in peripheral blood lymphocytes. *Neurology* 1996;47:1060-1064.
29. Gagliardi S, Cova E, Davin A et al. SOD1 mRNA expression in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2010;39(2):198-203.
30. Zimmer A, Nguyen QD, Gespach C. Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal* 2004;16(10):1085-104.