



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Dipartimento di Scienze Biomediche

Corso di laurea in Biotecnologie per l'Alimentazione

**Analisi dell'espressione di sistemi coinvolti nell'omeostasi
del Ca^{2+} in astrociti spinali di un modello murino di SLA**

Relatore: Prof. Alessandro Bertoli

Correlatore: Dott.ssa Rosa Pia Norante

Laureanda: Alessandra Carpanese

Matricola: 1110914

ANNO ACCADEMICO 2015-2016

INDICE

ABBREVIAZIONI	pag.	2
RIASSUNTO E ABSTRACT	pag.	5
1. LA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA	pag.	9
1.1 – Definizione, significato patologico e cenni storici	pag.	9
1.2 – Cenni epidemiologici e distribuzione della malattia	pag.	10
1.3 – Sintomatologia, diagnosi e terapia	pag.	11
2. MUTAZIONI GENICHE E MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELLA PATOLOGIA	pag.	13
2.1 – Tipologie di SLA, mutazioni correlate e fattori ambientali	pag.	13
2.2 – La superossido dismutasi 1	pag.	16
2.3 – Eccitotossicità da glutammato	pag.	19
2.4 – Anomalie strutturali e funzionali dei mitocondri	pag.	20
2.5 – Stress ossidativo	pag.	22
3. LE CELLULE COINVOLTE NELLA SLA	pag.	23
3.1 – I motoneuroni	pag.	23
3.2 – Gli astrociti	pag.	24
4. IL <i>SIGNALING</i> E L'OMEOSTASI DEL Ca ²⁺	pag.	26
4.1 – Il Ca ²⁺ come importante mediatore intracellulare	pag.	26
4.2 – I sistemi di trasporto del Ca ²⁺ attraverso la membrana plasmatica	pag.	28
4.3 – L'inflow e l'outflow del Ca ²⁺ nel reticolo endoplasmatico	pag.	31
4.4 – La traslocazione del Ca ²⁺ nei mitocondri	pag.	32
4.5 – Deregolazioni nell'omeostasi del Ca ²⁺ e malattie neurodegenerative	pag.	34
4.6 – Alterazioni dell'omeostasi del Ca ²⁺ in astrociti spinali	pag.	35
SCOPO DELLA TESI	pag.	36
5. MATERIALI E METODI	pag.	37
5.1 – Modelli murini e genotipizzazione	pag.	37
5.2 – Colture di astrociti primari	pag.	40
5.3 – Immunocitochimica	pag.	42
5.4 – Preparazione del campione e quantificazione delle proteine	pag.	43
5.5 – Western blot	pag.	44
5.6 – Analisi densitometrica	pag.	47
RISULTATI	pag.	48
BIBLIOGRAFIA	pag.	54

ABBREVIAZIONI

AMP: atrofia muscolare spinale

AMPA: α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo-propionato

APS: ammonio persolfato

ATP: adenosina trifosfato

BMAA: β -metilamino-L-alanina

CCS: copper chaperone for superoxide dismutase

CICR: calcium-induced calcium release

DDT: ditiotreitolo

DNA: acido deossiribonucleico

EAATs: excitatory amino acid transporters

ECL: Enhanced Chemi-Luminescence

ERMCC: ER Mitochondria Calcium Cycle

FUS/TLS: fused in sarcoma/translocated in liposarcoma

GABA: acido γ -amminobutirrico

GluR2: subunità del recettore ionotropico AMPA

HIV: human immunodeficiency virus

IP₃R: recettore dell'inositolo 1,4,5-trifosfato

LSB: Laemmli Sample Buffer

MCU: mitochondrial Ca²⁺ uniporter

MMI: membrana mitocondriale interna

MN: motoneuroni

mNCX: scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondriale

mRNA: RNA messaggero

NCKX: scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$

NCX: scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

NMDAR: N-metil-D-aspartato receptor

PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PBS: phosphate buffered saline

PFA: paraformaldeide

PIC: protease inhibitor cocktail

PMCA: plasma membrane Ca^{2+} ATPasi

PTP: permeability transition pore

PVDF: polivinildenfluoruro

RE: reticolo endoplasmatico

RNA: acido ribonucleico

ROCCs: receptor operated calcium channels

ROS: radicali liberi dell'ossigeno

RyR: recettore della rianodina

SDS: Sodio Dodecil Solfato

SERCA: sarco/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -transport ATPases

SLA: sclerosi laterale amiotrofica

SLAf: sclerosi laterale amiotrofica familiare

SLAs: sclerosi laterale amiotrofica sporadica

SLP: sclerosi laterale primaria

SMA: atrofia muscolare spinale

SNC: sistema nervoso centrale

SOCCs: store-operated calcium channels

SOCE: store-operated calcium entry

SOD: superossido dismutasi

STIM: stromal interaction molecules

TAR: Trans-Activation Response Element

TBE: Tris-borate-EDTA

TBS: BSA in PBS contenente Tween-20

TDP-43: TAR-DNA binding protein

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiammina

UPR: unfolded protein response

VOCCs: voltage operated calcium channels

WT: Wild-type

RIASSUNTO

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa progressiva che colpisce selettivamente sia il primo che il secondo motoneurone (MN) portando ad una Sclerosi della porzione Laterale del midollo spinale a cui è associata la perdita di trofismo muscolare (Amiotrofia).

Si tratta di una patologia con esordio attorno ai 50-65 anni che si manifesta con debolezza e perdita di tono muscolare, fascicolazioni e mancanza di coordinazione nei movimenti portando gradualmente ad una condizione di completa immobilità e paralisi polmonare negli stadi finali.

Esistono due tipologie di SLA: la forma sporadica, che è la più comune e riguarda il 90-95% dei casi, e quella familiare, che invece è associata ad un'ereditarietà prevalentemente di tipo autosomico dominante, e interessa il rimanente 5-10% dei casi.

Ad oggi, le cause patogenetiche della SLA rimangono in larga parte sconosciute, sebbene siano stati identificati diversi geni coinvolti nella malattia; tra le più note e rilevanti sono annoverate quelle a carico del gene codificante l'isoforma 1 della superossido dismutasi (SOD1) che sono responsabili di circa il 20% dei casi di SLA familiare.

Modelli transgenici murini esprimenti l'isoforma umana della SOD1 recante la mutazione missenso (SLA-associata) G93A, ricapitolano il fenotipo umano della SLA sporadica e familiare. Le cellule primariamente coinvolte nella patogenesi della malattia sono i MN, tuttavia stanno emergendo numerose evidenze che testimoniano il coinvolgimento di altri tipi cellulari, in particolare degli astrociti, che potrebbero concorrere – mediante effetti *in-trans* – alla degenerazione dei MN.

Gli astrociti instaurano interazioni sia di natura fisica che funzionale con i neuroni circostanti e sono attivamente coinvolti nel processo di trasmissione sinaptica grazie al fatto che rispondono a variazioni transienti della concentrazione di Ca^{2+} portando al rilascio di gliotrasmettitori necessari per la comunicazione intercellulare, e all'*uptake* di neurotrasmettitori potenzialmente neurotossici.

Di fondamentale importanza in questo lavoro di tesi è il ruolo centrale del Ca^{2+} nello sviluppo delle malattie neurodegenerative: deregolazioni nell'omeostasi dello ione in diversi compartimenti cellulari rappresentano, infatti, un tratto comune di queste patologie.

In particolare, si ritiene che alterazioni del metabolismo del Ca^{2+} negli astrociti concorrano ad eventi precoci nella patogenesi della SLA.

Il presente lavoro di tesi prende spunto dalle evidenze acquisite nel corso di un lavoro precedentemente condotto presso il laboratorio del prof. Bertoli, che – basandosi su misure di flussi locali di Ca^{2+} mediante l'uso di sonde geneticamente ingegnerizzate – ha dimostrato come l'espressione del mutante SLA-associato $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ induca alterazioni nei flussi dello ione in diversi compartimenti cellulari di astrociti spinali primari.

Pertanto, per spiegare il fenotipo del Ca^{2+} in termini molecolari, in questo lavoro di tesi è stata avviata un'analisi comparativa dei livelli di espressione di diverse proteine direttamente coinvolte nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} in astrociti derivati da topi SLA esprimenti il mutante $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ e la controparte esprimente la SOD1 *wild-type*.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease that selectively affects both the first and the second motor neuron (MN) leading to wrinkling (Sclerosis) of the spinal cord's Lateral portion, with associated loss of muscle trophism (Amyotrophic).

This disorder has an average onset at 50-65 years of age, and manifests by weakness and loss of muscle tone, fasciculations and loss movement' coordination, which gradually lead to a condition of complete immobility and, in the final stages, pulmonary paralysis.

There are two types of ALS: the sporadic form, which is the most common and affects 90-95% of cases, and the familial form that is associated with an autosomally dominant inheritance pattern and involves the remaining 5-10% of cases.

The pathogenetic causes involved in ALS remains largely unknown, although different genetic mutations associated with the disease have been identified; among them, the most studied are those occurring in the gene encoding the isoform 1 of superoxide dismutase (SOD1), which are responsible for about 20% of familial ALS cases.

In addition to, or associated with, genetic alterations, a number of anomalies in various cellular processes fundamental for correct neuronal functions were also found in ALS.

Although MNs are the primary ALS target, an emerging body of evidence testify the involvement of astrocytes in disease pathogenesis.

Indeed, astrocytes establish both physical and functional interactions with neighboring neurons, and are actively involved in the process of synaptic transmission by responding to transient changes in their local Ca^{2+} concentrations with the release of gliotransmitters necessary for intercellular communication.

Another aspect of fundamental importance for this work, is the role that Ca^{2+} plays in many neurodegenerative disorders, implying that the deregulation of the ion homeostasis is key to different neurodegenerative processes, including ALS.

The present work is based on previous evidence obtained by use of genetically engineered Ca^{2+} probes – that deregulation of Ca^{2+} control occurs in different cellular compartments of primary cultured spinal astrocytes derived from transgenic mice expressing the human SOD1^{G93A} missense mutant, a well-established ALS animal model.

Following such previous results, the present work aims at identifying possible molecular mechanism for the observed Ca^{2+} phenotype in ALS astrocytes.

To this purpose, a preliminary comparative analysis of the expression levels of proteins involved in the control of Ca^{2+} homeostasis was performed in primary astrocytes expressing the ALS-related $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ mutant and the healthy counterpart.

1.LA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

1.1 Definizione, significato patologico e cenni storici

Le malattie del motoneurone sono un gruppo di patologie neuromuscolari che colpiscono primariamente i neuroni di moto o motoneuroni (MN); a questa categoria appartengono la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) che è la più grave, la sclerosi laterale primaria (SLP), l'atrofia muscolare progressiva (AMP), la paralisi bulbare progressiva e l'atrofia muscolare spinale (SMA).

La SLA è una malattia neurodegenerativa progressiva e costantemente fatale che colpisce selettivamente il primo e il secondo MN localizzati nella corteccia cerebrale, nel tronco encefalico e nel midollo spinale.

La sua etimologia permette di far luce sugli aspetti principali di questa patologia: il termine sclerosi fa riferimento al processo fisiopatologico che determina fenomeni di danno irreversibile a carico dei MN i quali vanno incontro a degenerazione con perdita delle strutture cellulari e degli assoni a cui è associato un tipico pallore delle vie mielinizzate.

Questi eventi culminano con la morte cellulare a seguito della quale si verifica una riorganizzazione del tessuto parenchimatico a causa di un'intensa reazione proliferativa dell'astroglia che determina un graduale raggrinzimento e indurimento tissutale riscontrato nelle zone colpite.

L'aggettivo laterale invece identifica l'area specifica del midollo spinale interessata ossia i fasci discendenti del cordone laterale, un insieme di fibre nervose che connettono il primo MN al secondo situato nelle corna anteriori. Queste fibre sono deputate al controllo dei movimenti volontari in quanto trasmettono gli impulsi nervosi ai muscoli del tronco e degli arti.

Il termine amiotrofico deriva dalla fusione di tre partizioni derivanti dal greco in cui "a" corrisponde alla negazione, "mio" sta per muscolo e "trophé" che significa nutrimento.

Quindi definisce una condizione di atrofia ossia un processo regressivo che determina la riduzione del volume cellulare per mancanza di sostanze trofiche il quale si riflette in una globale involuzione degli organi colpiti, in tal caso dei muscoli.

Questo evento può essere interpretato come la conseguenza del danno neuronale infatti se non pervengono più gli stimoli nervosi ai muscoli questi vanno incontro ad un'atrofizzazione da ipofunzione o inattività.

In sostanza il significato letterale corrisponde ad un raggrinzimento (sclerosi) della porzione laterale del midollo spinale associato alla perdita del trofismo muscolare (amiotrofica).

La SLA è anche definita come malattia di Charcot dal nome del neurologo francese Jean-Martin Charcot che per primo descrisse questa patologia nel 1869.

Successivamente acquisì sempre più notorietà presso il pubblico perché colpì molti personaggi famosi del mondo sportivo, primo fra tutti il giocatore di baseball Henry Louis Gehrig ma anche altri calciatori tanto da ritenere che questa malattia fosse associata a fattori ambientali di natura tossicologica, quali presenza di metalli pesanti e pesticidi, o a fattori professionali.

Uno studio di coorte condotto in Italia prese in esame un ampio gruppo di calciatori professionisti in cui furono accertate varie decine di casi di SLA, questo portò ad ipotizzare una correlazione significativa tra le lesioni alla testa e un aumento del rischio della malattia, tuttavia questa teoria non è stata dimostrata (Abel, 2007).

Negli anni '60 la SLA colpì anche il cosmologo, matematico e fisico britannico Stephen Hawking.

1.2 Cenni epidemiologici e distribuzione della malattia

Gli studi epidemiologici indicano che l'incidenza mondiale della SLA varia da 1,7 a 2,3 casi ogni 100.000 abitanti facendo registrare un andamento costante nel tempo, da ciò emerge la scarsa diffusione e la rarità di questa patologia (Johnston *et al.*, 2006).

Questo indice comunque aumenta all'aumentare dell'età con valori che sfiorano i 6,1-10,2 casi ogni 100.000 individui nella fascia d'età compresa tra i 70 e gli 80 anni (Forbes *et al.*, 2004).

La malattia colpisce entrambi i sessi ma con una lieve preponderanza nei maschi infatti il rapporto è di circa 1,5:1 (Huisman *et al.*, 2011).

Interessa soprattutto le persone adulte con un'età media di esordio attorno ai 50-65 anni e meno del 5% dei casi ha un'età inferiore a 30 anni (Logroscino *et al.*, 2008).

Tuttavia esistono delle aree geografiche in cui la prevalenza della SLA è 50-100 volte superiore rispetto a qualsiasi altra regione del mondo come la penisola di Kii e altre zone del Giappone, il sud est della Nuova Guinea e presso la popolazione dei Chamorro residente nell'isola di Guam.

È probabile ma non certo che questo sia legato a fattori alimentari legati al consumo dei semi di piante cicadi contenenti un amminoacido non proteico neurotossico, il β -metilamino-L-alanina (BMAA), prodotto da un cianobatterio simbiote presente nelle radici di queste piante di conseguenza è stato ipotizzato che le persone affette non siano in grado di contrastare l'accumulo di questo composto (Bradley e Mash, 2009; Kuzuhara e Kokubo, 2005).

1.3 Sintomatologia, diagnosi e terapia

La SLA generalmente ha un decorso piuttosto lento ed è caratterizzata da un'ampia variabilità fenotipica in base al sito di esordio, al tipo di MN colpito, all'entità e alla velocità con cui si estendono i danni neuronali; a seconda di questi aspetti è possibile individuare due forme principali ossia la SLA classica e la SLA bulbare.

La prima è la più comune ed è caratterizzata da un esordio spinale con coinvolgimento dei muscoli innervati dai MN situati nel midollo spinale.

Il primo segno corrisponde a debolezza asimmetrica nell'estremità distale di un arto, in genere un piede, con cadute frequenti e inspiegabili, difficoltà nella camminata e andatura a volte vacillante, lentezza nei movimenti di una mano e mancanza di coordinazione.

A questo fenotipo sono associati sintomi riconducibili a danni del secondo MN che includono debolezza, atrofia muscolare, fascicolazioni, crampi e iporreflessia mentre le manifestazioni relative al primo MN corrispondono a ipertonìa, spasticità, iperreflessia e riflessi patologici come il segno di Babinski e quello di Hoffman (Ravits e La Spada, 2009).

La malattia progredisce portando alla perdita delle capacità motorie fino ad arrivare alla completa immobilità negli stadi finali inoltre vengono riscontrate difficoltà respiratorie (dispnea) che evolvono in una paralisi polmonare a cui si può porre rimedio ricorrendo alla ventilazione meccanica (Figura 1).

Circa il 20-30% dei casi invece è ad esordio bulbare in questo caso sono interessati i muscoli innervati dai MN presenti nel bulbo encefalico.

I segni riconducibili a danni del primo MN comprendono lentezza nel linguaggio e nei movimenti della lingua, riflesso palmo-mentoniero e riflesso mandibolare.

I segni del secondo MN includono debolezza dei muscoli facciali con scarsa espressività, ridotta elevazione palatale, difficoltà nell'articolazione della parola (disartria), atrofia e fascicolazioni della lingua; di conseguenza si verificano disturbi della masticazione e della deglutizione (disfagia).

Inoltre possono essere presenti anche segni pseudobulbari quali alterazione della fonazione, pianto e risata incontrollata (Chio et al., 2011).

La prognosi è peggiore nella SLA con esordio bulbare in quanto le disfunzioni respiratorie sopraggiungono precocemente.

In genere la SLA interessa raramente i muscoli che controllano i movimenti oculari e quelli degli sfinteri esterni inoltre i cinque sensi, il pensiero e le attività mentali rimangono pressoché inalterati quindi i malati sono consci di tutto ciò che succede attorno a loro.

Tuttavia sono noti casi con quadri neuropsicologici associati a schizofrenia, disturbi bipolari, depressione, ansietà e demenza fronto-temporale (Turner et al. 2016).

In quasi la metà dei casi si può verificare una compromissione cognitiva durante l'evoluzione della malattia e nel 15% dei pazienti la SLA può evolvere in demenza fronto-temporale che comporta cambiamenti della personalità, anomalie comportamentali, disfunzioni del linguaggio e compromissione della memoria (Ringholz et al., 2005).

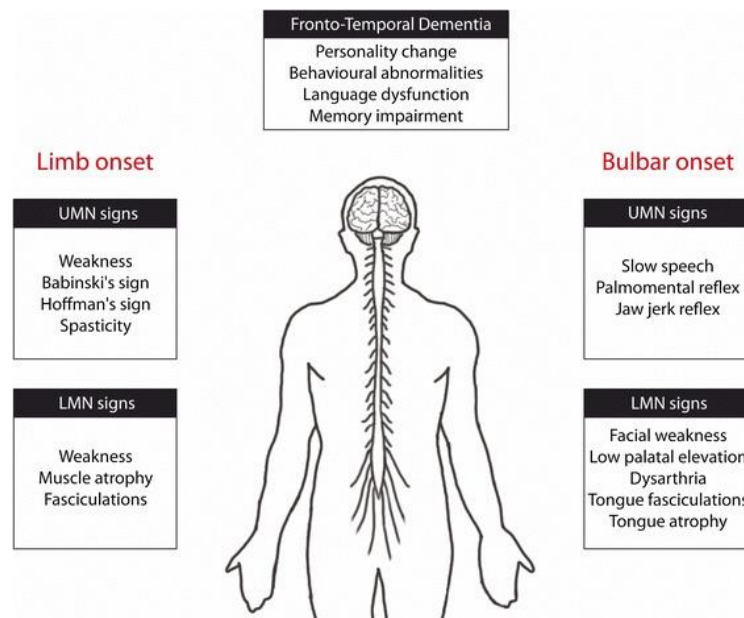


Figura1. Segni e sintomi suddivisi in base alla regione di esordio e al MN interessato (Picher-Martel et al., 2016)

Per quanto riguarda l'aspetto diagnostico, non esistono test o marcatori biologici rilevabili nel sangue, in altri fluidi o nel muscolo che consentano una diagnosi specifica e definitiva.

In generale la diagnosi si basa sull'osservazione dei segni relativi ai MN primari e secondari, sull'analisi del DNA per rilevare mutazioni geniche, sugli studi elettrofisiologici mediante elettromiografia per misurare la velocità di conduzione nervosa motoria e sensitiva, e sulle tecniche di *neuroimaging* al fine di studiare l'attività e la funzionalità cerebrale.

Attualmente non esiste un farmaco in grado di curare la malattia o bloccarne la progressione; sono stati, tuttavia, sviluppati vari agenti terapeutici palliativi in grado di alleviare i sintomi della malattia, ma sono ancora in corso di trial clinici.

Il riluzolo al momento è l'unico trattamento farmacologico approvato ed è la sola sostanza in grado di aumentare, seppur in modo marginale, l'aspettativa di vita dei malati. Esso ha un'azione anti-glutamatergica in quanto inibisce i canali del sodio voltaggio-dipendenti diminuendo il rilascio di glutammato nello spazio pre-sinaptico e, di conseguenza, contrasta il suo effetto neurotossico (Miller et al., 2012).

La prognosi varia a seconda dell'età di esordio e del fenotipo manifestato ma in genere l'aspettativa media di vita varia dai 2 ai 4 anni dal momento della diagnosi e solo un 5-10% dei pazienti sopravvive oltre i 10 anni (Chiò et al., 2013).

2. MUTAZIONI GENICHE E MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELLA PATOLOGIA

2.1 Tipologie di SLA, mutazioni correlate e fattori ambientali

Esistono due tipologie di SLA: la forma sporadica (SLAs) che è la più comune e riguarda il 90-95% dei casi e quella familiare (SLAf) che invece è associata ad un modello ereditario, in genere, di tipo autosomico dominante e interessa il rimanente 5-10% dei casi. Entrambe hanno caratteristiche fenotipiche simili e sono indistinguibili dal punto di vista clinico e patologico, mentre l'unica differenza è che la forma familiare ha un esordio più precoce.

Per quanto riguarda la SLAs è opinione diffusa che si tratti di una patologia multifattoriale legata a varianti poligeniche e a fattori di rischio ambientali quali pesticidi, metalli pesanti, agenti chimici, traumi, dieta, fumo, radiazioni e campi elettro-magnetici, i quali esercitano la loro influenza sulla suscettibilità genetica individuale (Wang et al., 2014).

Le cause patogenetiche della SLA rimangono tutt'ora oscure sebbene siano state individuate delle mutazioni monogeniche associate alla forma ereditaria.

Sono stati caratterizzati più di 30 geni mutati nei soggetti malati ma solo alcuni sono considerati epidemiologicamente rilevanti e validi ai fini dei test genetici.

Tra quelli più importanti sono compresi i geni che codificano per i seguenti prodotti genici: superossido dismutasi 1 (SOD1), TAR-DNA *binding protein* (TDBP-43), *Fused in Sarcoma/Translocated in Liposarcoma* (FUS/TLS) ed è nota anche un'espansione esanucleotidica deleteria presente nel primo introne della *Open Reading Frame 72* del cromosoma 9 (*C9orf72*) che rappresenta la causa molecolare più frequente con circa il 40-50% dei casi di SLAf (Navone et al., 2015) (Figura 2).

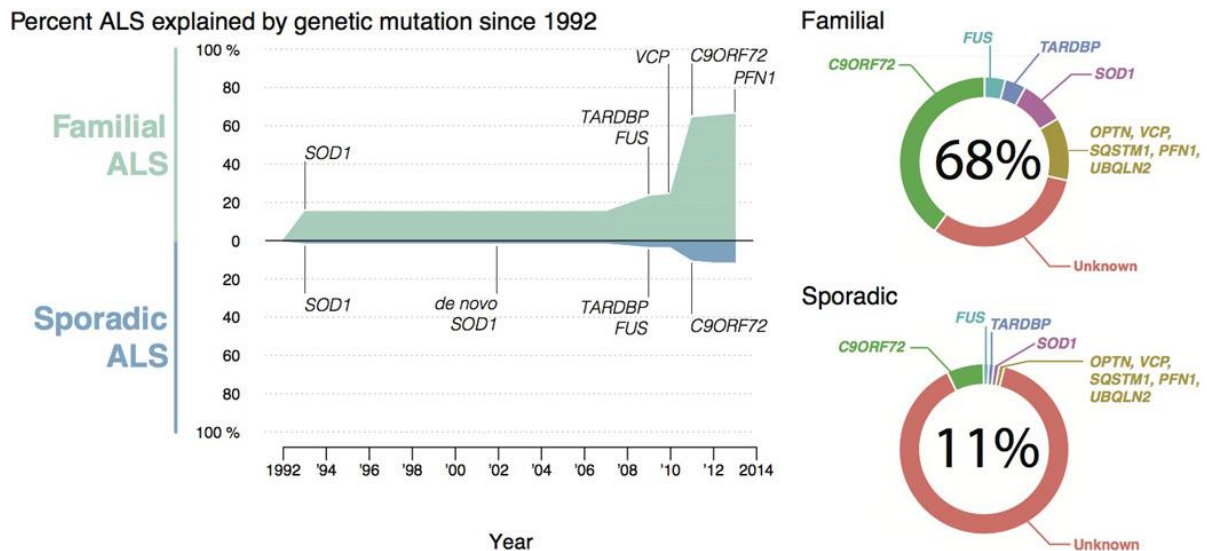


Figura 2. Principali geni mutati correlati con la fSLA e con la sSLA (Renton et al., 2014).

TDP-43 è una proteina nucleare altamente conservata ed espressa in vari tessuti che viene codificata dal gene TARDBP situato nella regione cromosomica 1p36.2, è coinvolta nella regolazione della trascrizione, dello splicing dei trascritti e nella stabilità degli mRNA.

Nel SNC è localizzata nel nucleo dei neuroni e delle cellule gliali tuttavia, la sua funzione non è ancora del tutto nota anche se studi recenti suggeriscono un ruolo nella plasticità neuronale (Wang et al., 2008).

La sua struttura contiene due domini di riconoscimento dell'RNA e una coda C-terminale ricca di glicina che permette il legame a singoli filamenti di DNA, RNA e proteine.

Inizialmente fu identificata come una proteina capace di legarsi al *Trans-Activation Response Element* (TAR) del virus dell'HIV agendo da repressore della trascrizione ma in seguito è stato determinato che è in grado di interagire con molte altre ribonucleoproteine (Wang et al., 2004).

In base ad uno screening genetico sono state identificate 16 diverse mutazioni puntiformi missenso in un gruppo di pazienti affetti da SLA dei quali otto avevano la forma familiare e i restanti la forma sporadica (Kabashi et al., 2008) (Figura 3).

Tra queste mutazioni sono annoverate 1077G>A (A315T), 1009A>G (M337V) e 1278G>A le quali si traducono in una perdita della normale funzione di TDP-43 in quanto portano alla formazione di aggregati citoplasmatici tossici della proteina contenenti anche altre proteine non correttamente ripiegate (Buratti et al., 2008).

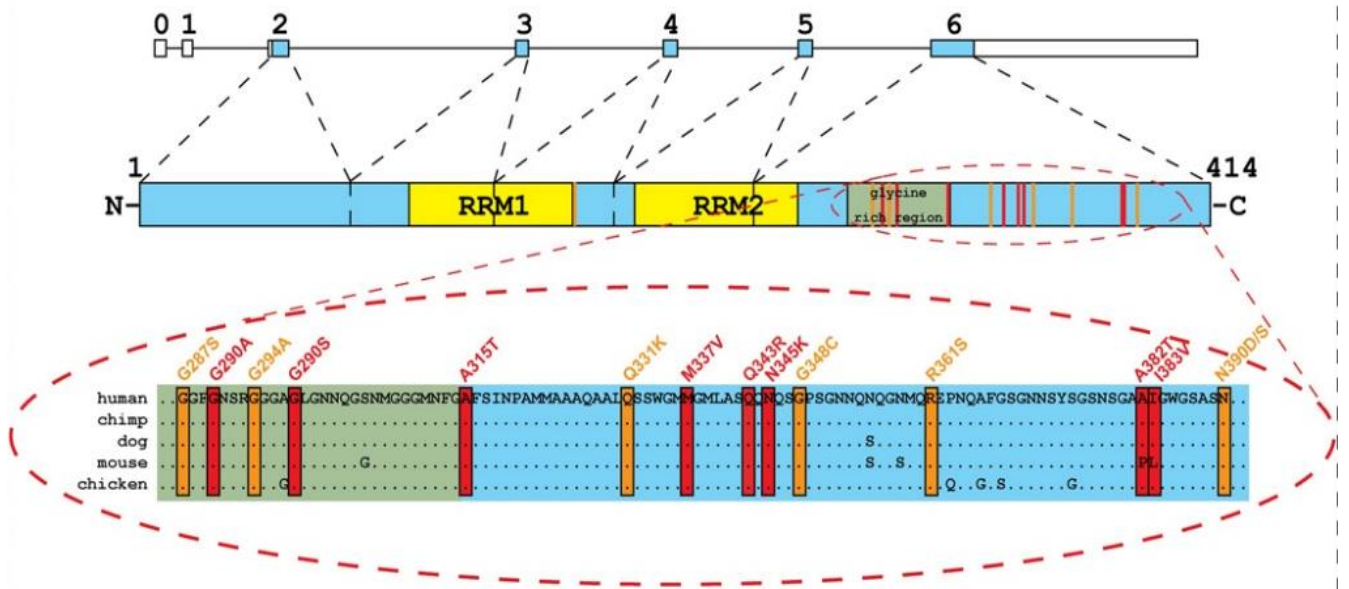


Figura 3. Rappresentazione schematica del gene TARDBP e mutazioni missenso nel C-terminale (sopra).

Allineamento della sequenza proteica; i riquadri arancioni mostrano le mutazioni rilevate nella sSLA mentre i riquadri rossi indicano le mutazioni relative alla fSLA (sotto) (Mackenzie e Rademakers, 2010).

FUS/TLS è una proteina multifunzionale che analogamente alla TDP-43 è in grado di legare sia il DNA che l'RNA e funge da navetta migrando continuamente tra il nucleo e il citoplasma (Zinszner *et al.*, 1997; Ayala *et al.*, 2008); essa è coinvolta in vari step dell'espressione genica ossia nella regolazione della trascrizione, nello splicing dei trascritti e nel processamento dei miRNA (Buratti e Baralle, 2008).

A livello neuronale è implicata nel trasporto degli mRNA regolando la traduzione in modo spazio-temporale in sinapsi e dendriti (Fujii *et al.*, 2005).

Sono state descritte circa 22 mutazioni puntiformi associate alla forma familiare 12 delle quali sono localizzate nella regione C-terminale (Belzil *et al.*, 2009) che serve per la traslocazione della proteina nel nucleo, di conseguenza queste mutazioni portano ad un accumulo proteico nel citoplasma (Kwiatkowski *et al.*, 2009) (Figura 3).

2.2 La superossido dismutasi 1

Con il termine superossido dismutasi (SOD) si intende un gruppo di metalloenzimi appartenenti alla classe delle ossidoreduttasi che hanno la funzione di detossificare e proteggere le cellule dall'azione dei radicali liberi dell'ossigeno, prodotti principalmente a livello della catena respiratoria mitocondriale.

Questo processo induce la produzione di un'elevata quantità di prodotti intermedi reattivi soprattutto in corrispondenza dei complessi I e III i quali rilasciano ioni superossido su entrambi i lati della membrana mitocondriale interna.

Di conseguenza sono necessari enzimi dedicati in grado di catalizzare la reazione di conversione dell'anione superossido in perossido di idrogeno ($O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$): ciò è possibile grazie all'ossidazione dello ione metallico contenuto nel sito attivo della SOD che consente il trasferimento di un elettrone alla molecola reattiva bersaglio (Figura 4).

Tuttavia anche il H_2O_2 generato è un pericoloso radicale il quale però viene prontamente inattivato grazie all'intervento di altri sistemi quali, ad es., la catalasi.

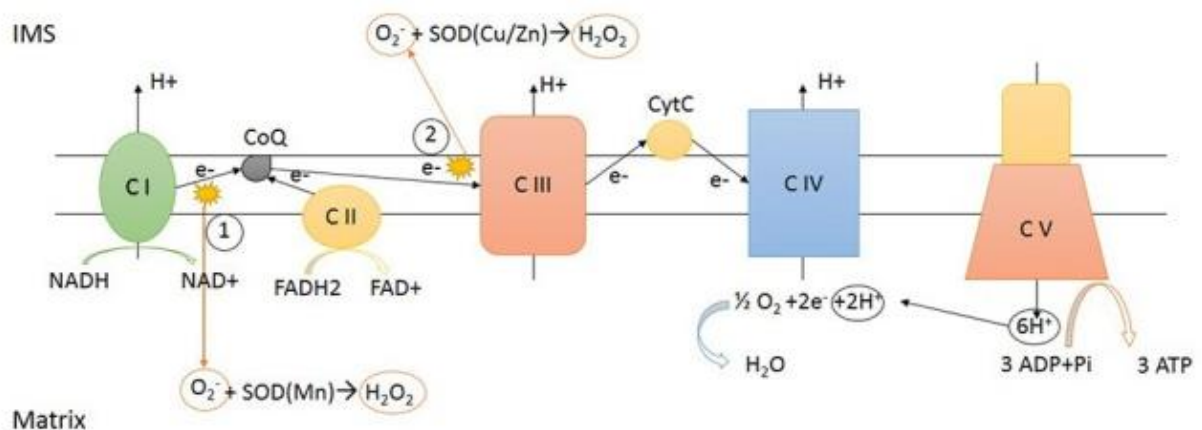


Figura 4. Meccanismo di funzionamento e localizzazione degli enzimi SOD (Tafuri et al., 2015).

Il genoma umano codifica per tre isoforme di SOD che differiscono in base alla struttura, ai cofattori metallici e alla localizzazione cellulare.

La SOD1 è una proteina di 17 kDa codificata da un gene che mappa in corrispondenza della regione cromosomica 21q22.11; è caratterizzata da una struttura omodimerica e ciascuna subunità è formata da 8 foglietti β antiparalleli che nel complesso si organizzano a formare un dominio β -barrel caratterizzato da un ampio loop preposto al legame degli ioni metallici ossia il rame e lo zinco (Tainer et al., 1982) (Figura 5).

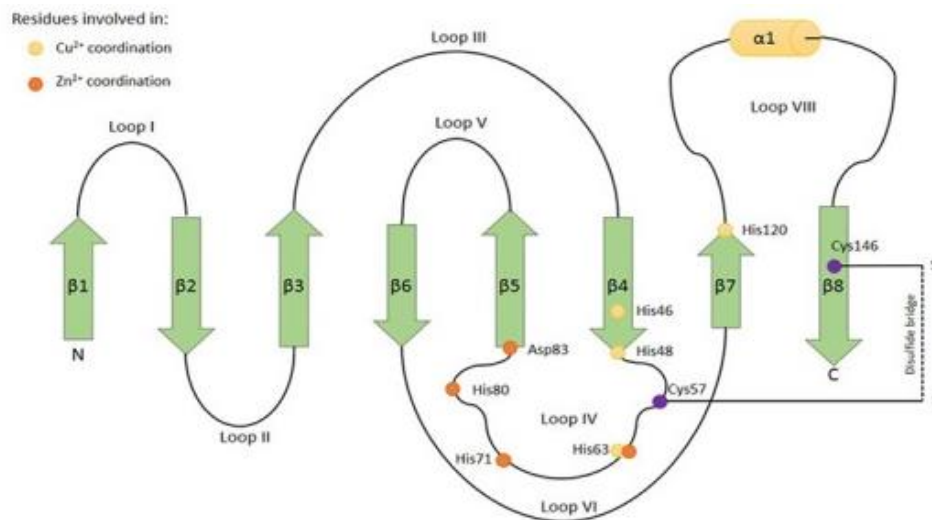


Figura 5. Struttura terziaria della SOD1 umana (Tafari *et al.*, 2015).

Si tratta di un enzima ubiquitario e altamente conservato tra le specie (Fridovich, 1995), ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica ma una piccola frazione si trova anche nel nucleo, nei lisosomi e nello spazio intermembrana dei mitocondri (Sturtz *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 1988; Keller *et al.*, 1991; Crapo *et al.*, 1992).

Nei mammiferi esistono altre due SOD aventi una struttura tetrameriche le quali sono codificate da geni mappati su cromosomi differenti ossia la SOD2 e la SOD3: la prima contiene il manganese nel suo centro di reazione e si localizza nella matrice mitocondriale (Zelko *et al.*, 2002) mentre la seconda possiede il rame e lo zinco e si trova nella matrice extra-cellulare (Marklund *et al.*, 1982).

Nel 1993 fu identificata la prima mutazione nel gene codificante per la SOD1 associata alla SLA la quale è stata descritta come il primo difetto molecolare associato all'insorgenza della malattia (Rosen *et al.*, 1993).

Attualmente sono note più di 155 mutazioni della SOD1, le quali sono responsabili di circa il 20% dei casi di SLA familiare, e associate al 3% dei casi di SLA sporadica, e ciò consente di includerla tra le cause più comuni di questa malattia (Pasinelli e Brown, 2006).

Si tratta soprattutto di mutazioni puntiformi missenso ad ereditarietà dominante, sebbene siano stati descritti anche casi ad eredità recessiva specialmente nelle varianti a bassa penetranza (Synofzik *et al.*, 2012). Tra le più studiate è compresa la mutazione G93A che consiste in una sostituzione in posizione 93 della sequenza proteica di una glicina al posto dell'alanina, sono note anche la G37R, G86R e L126Z (Figura 6).

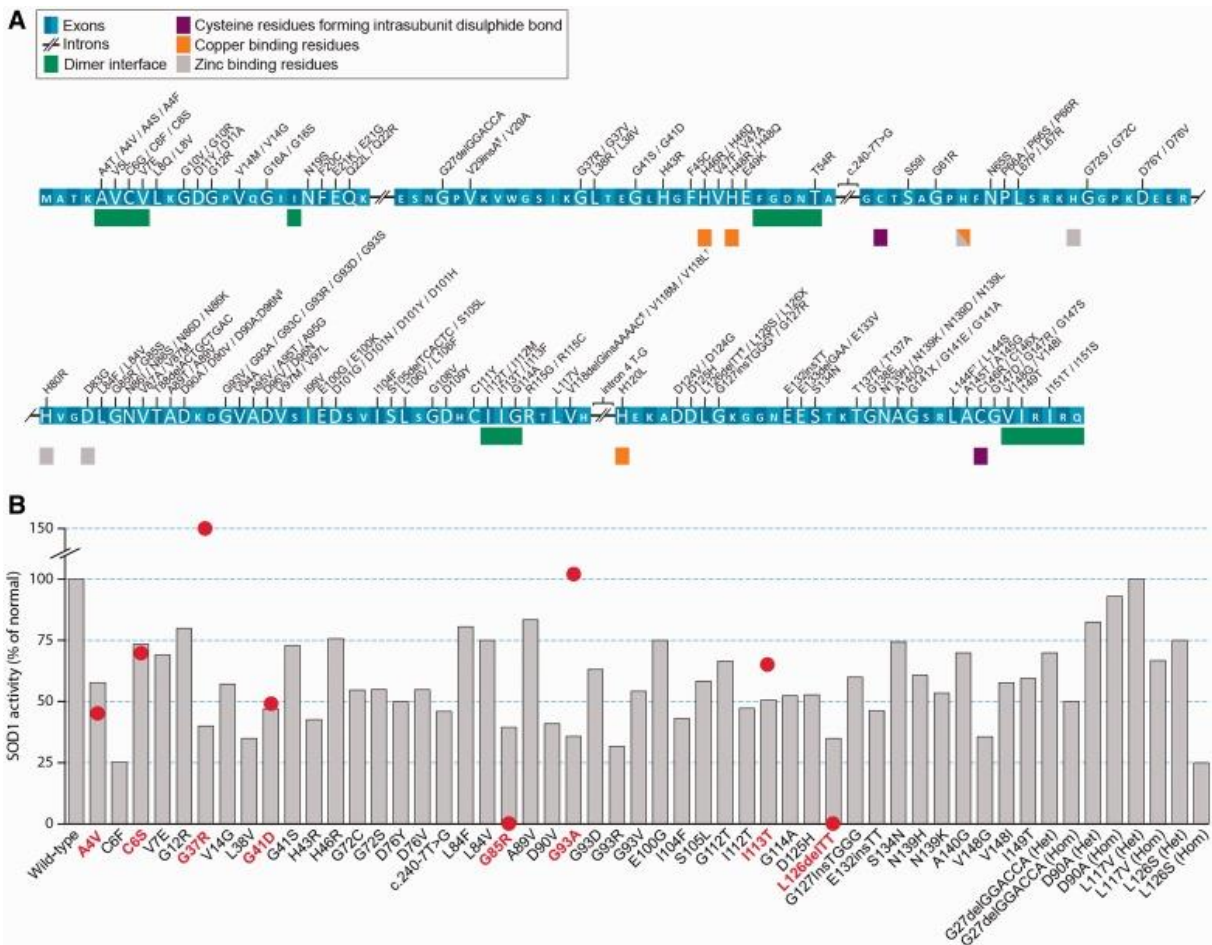


Figura 6A. Mutazioni della SOD1 identificate in pazienti malati di SLA (ALS online database ALSod (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>)).
Figura 6B. Diagramma delle mutazioni identificate, con la relativa capacità enzimatica, rinvenute in pazienti dal 1993 al 2012.

I mutanti per la SOD1 mostrano differenti proprietà in base ai residui interessati: alcuni non mostrano attività catalitica, mentre in altri è pienamente conservata come nel caso della mutazione G93A (Rotunno, 2013). Altri ancora mostrano una tendenza ad accumularsi e a formare aggregati ad alto peso molecolare con attività citotossica i quali rappresentano un tratto comunemente riscontrato nei soggetti malati. La relazione tra la formazione di aggregati insolubili e l'espressione dei segni tipici della malattia è stata ampiamente confermata da numerosi studi condotti in modelli murini (Johnston *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003).

Altre manifestazioni di mutanti SOD1 comprendono il *misfolding* proteico e una scorretta localizzazione intracellulare: infatti sono state rilevate quantità superiori di proteina non correttamente ripiegata nei mitocondri del midollo spinale di topi recanti la SOD1 mutata (Zetterström *et al.*, 2007).

Per funzionare adeguatamente, assumere la corretta conformazione e la giusta localizzazione intracellulare, la SOD1 richiede delle modificazioni post-traduzionali inclusa la formazione di legami disolfuro intramolecolari per garantirne il corretto *folding*, l'associazione con ioni metallici e l'esposizione di una regione idrofobica necessaria per l'organizzazione in dimeri; tutte queste modifiche sono mediate da un *chaperon* molecolare specifico noto come *copper chaperone for superoxide dismutase* (CCS) (Culotta *et al.* 1997).

Il CCS è una sorta di sensore redox che regola la distribuzione e l'attivazione della SOD1 infatti la loro localizzazione è strettamente inter-dipendente.

Un'elevata concentrazione di O₂ nel citosol mantiene il CCS in questo comparto, dove favorisce il *folding* dell'apoenzima, mentre condizioni di ipossia promuovono il passaggio del *chaperon* nel mitocondrio.

Qui il CCS è in grado di mediare la maturazione dell'enzima SOD1, il quale poi non è più in grado di ritornare nel citosol rimanendo confinato nel mitocondrio (Kawamata e Manfredi, 2008).

Nel caso in cui l'equilibrio di questo meccanismo non fosse mantenuto si possono verificare degli accumuli anomali di proteine con una struttura terziaria aberrante e instabile nello spazio inter-membrana dei mitocondri in cui possono precipitare in una forma insolubile contribuendo in tal modo all'insorgere di disfunzioni mitocondriali (Banci *et al.*, 2012).

Inoltre lo stress ossidativo induce la dissociazione dei dimeri che costituiscono la SOD1 dando origine a intermedi caratterizzati da una tendenza all'aggregazione e in questa forma viene persa completamente l'attività enzimatica (Khare *et al.*, 2004; Wilcox *et al.*, 2009).

Ciò risulta molto più pronunciato nei motoneuroni dal momento che sono più suscettibili a stress ossidativo rispetto ad altri tipi cellulari e ad altre popolazioni neuronali (Barber e Shaw, 2010).

2.3 Eccitotossicità da glutammato

L'-L-glutammato è il maggior neurotrasmettitore ad attività eccitatoria presente nel sistema nervoso centrale: di conseguenza un'eccessiva stimolazione dei neuroni da parte di questa molecola provoca morte neuronale e processi patologici associati alla sua azione eccitotossica. Esso è quindi annoverato tra i fattori responsabili di un'ampia gamma di disordini neurologici tra cui anche la SLA a causa del fatto che, oltre ad un *overload* neuronale di Ca²⁺, induce alterazioni del potenziale di membrana dei mitocondri e un'iper-produzione di radicali liberi.

Circa il 40-75% dei casi di SLA evidenzia difetti nel trasporto del glutammato con accumulo anomalo in sede extracellulare nel midollo spinale dei malati, il che suggerisce un ruolo importante di tale amminoacido nella degenerazione dei motoneuroni (Rothstein *et al.*,1995). Durante la normale neurotrasmissione, il glutammato viene sintetizzato nel terminale pre-sinaptico e poi viene rilasciato nella fessura inter-sinaptica, mediante specifiche vescicole, a seguito della generazione del potenziale d'azione e del conseguente aumento della concentrazione pre-sinaptica di Ca^{2+} ; qui va ad attivare i recettori post-sinaptici e poi viene rimosso da specifici trasportatori posti sulla membrana di neuroni e astrociti noti come *excitatory amino acid transporters* (EAATs).

Il continuo rilascio e rimozione di glutammato mantiene bilanciato il gradiente di concentrazione, ma se questo meccanismo non avviene correttamente il glutammato si accumula nello spazio inter-sinaptico con conseguente danno neuronale, a causa di una sovra-stimolazione eccitotossica dei recettori di questa molecola ed eccessivo accumulo post-sinaptico di Ca^{2+} (Shaw *et al.*, 2000).

È stato dimostrato che il midollo spinale di pazienti affetti da SLA e di topi transgenici esprimenti la SOD1 mutata hanno livelli inferiori dei trasportatori EAATs con conseguente aumento in sede extracellulare di glutammato, degenerazione neuronale, eccessivo afflusso di Ca^{2+} e Na^+ e una serie di altri processi deleteri (Ferraiuolo *et al.*, 2011).

Inoltre è stato riscontrato un livello inferiore di mRNA di EAATs nelle aree colpite e nel fluido cerebrospinale dei malati, dovuto ad una ritenzione anomala di introni nel trascritto del trasportatore (Honig *et al.*,2000).

2.4 Anomalie strutturali e funzionali dei mitocondri

I mitocondri sono organelli essenziali per qualsiasi tipo di cellula in quanto rappresentano la centrale energetica deputata al rifornimento dell'ATP necessaria per una moltitudine di processi cellulari. Inoltre sono il fulcro di altri *pathway* metabolici e costituiscono la fonte primaria di specie reattive dell'ossigeno, partecipano alla regolazione dell'apoptosi e fungono da *stores* del Ca^{2+} intracellulare.

Le disfunzioni mitocondriali sono state documentate in un'ampia gamma di disordini neurologici tra cui l'Alzheimer e il Parkinson inoltre ci sono sempre più evidenze che anomalie a carico di tali organelli siano cruciali anche nella patogenesi della SLA (Kawamata e Manfredi, 2010).

È stato osservato che i MN in via di degenerazione sono caratterizzati da aspetti comunemente riscontrabili, quali mitocondri con una morfologia atipica, deviazioni dal normale processo bioenergetico, deregolazioni nell'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare e da un trasporto assonale difettivo.

Le evidenze emerse dai modelli murini SOD1, dimostrano che le anomalie mitocondriali appaiono prima che si manifesti la degenerazione neuronale e la paralisi suggerendo che questo aspetto rappresenta un danno iniziale attivamente coinvolto nella patogenesi e nel progresso della malattia.

Le alterazioni morfologiche dei mitocondri comprendono rigonfiamento dell'organello con aumento del volume delle creste, frammentazione delle membrane e vacuolizzazione; queste caratteristiche sono state ampiamente descritte negli stadi precoci della malattia in topi esprimenti la SOD1 mutata e, in modo molto simile, anche nei tessuti di soggetti malati (Dal Canto e Gurney, 1994).

Al momento dell'esordio, la respirazione mitocondriale e la sintesi di ATP risultano ridotte sia nel cervello che nel midollo spinale di topi SOD1^{G93A} e di pazienti malati.

Nelle biopsie prelevate dai muscoli scheletrici di alcuni pazienti sono emerse perturbazioni nell'omeostasi dell'energia e deficit di ATP; inoltre, alcuni studi hanno evidenziato una diminuzione dell'attività dei complessi I e IV della catena respiratoria a cui è associato un ridotto metabolismo energetico (Pasinelli *et al.*, 2006).

Unitamente a ciò, sono state determinate anche delle deviazioni nel trasporto del Ca^{2+} , e in particolare nel suo *uptake* mitocondriale, che portano ad un aumento della concentrazione intracellulare favorendo il sovraccarico dello ione nella matrice dei mitocondri oltre il limite della loro capacità.

Questo si traduce in una depolarizzazione degli organelli con dissipamento del potenziale di membrana a cui fa seguito il deficit di ATP, nell'iper-produzione di specie reattive dell' O_2 che inducono stress ossidativo e in una variazione della permeabilità della membrana esterna con conseguente afflusso di soluti (Hunter e Haworth, 1979).

Disturbi di questo meccanismo predispongono i MN ad andare incontro a degenerazione e infine a morte, anche perché un sovraccarico di Ca^{2+} nei mitocondri porta all'attivazione della cascata apoptotica (Pasinelli *et al.*, 2000).

La regolazione del trasporto mitocondriale lungo gli assoni è un altro elemento fondamentale per la sopravvivenza dei neuroni. Infatti, questi organelli vengono costantemente veicolati da

una zona neuronale all'altra (ad es. verso le sinapsi che hanno un'elevata richiesta energetica per le loro funzioni) al fine di sopperire in modo spazio-temporale alle necessità metaboliche. Sono state descritte disfunzioni nel trasporto assonale dei mitocondri implicando che una localizzazione impropria o una mancanza di questi organelli nei siti cellulari strategici in cui c'è una maggiore richiesta metabolica, come le sinapsi o i nodi di Ranvier, gioca un ruolo fondamentale nel processo di denervazione e di degenerazione neuronale.

Tutti gli effetti deleteri sopracitati sembrano ricollegarsi proprio agli accumuli della SOD1 e alle interazioni aberranti che stabilisce con altre proteine: ad esempio è stato osservato che la dismutasi è in grado di formare legami con i complessi dineina-actina coinvolti nel trasporto assonale (Zhang *et al.*, 2007), con il mediatore antiapoptotico Bcl2 (Pasinelli *et al.*, 2004) ma anche con l'enzima lisil-tRNA sintetasi (Kawamata *et al.*, 2008).

2.5 Stress ossidativo

Anche lo stress ossidativo è stato spesso implicato nella patogenesi della SLA. Per stress ossidativo si intende lo squilibrio tra la produzione di radicali liberi dell'O₂ (ROS) e la loro neutralizzazione grazie ai sistemi antiossidanti presenti nelle cellule (Forsberg *et al.*, 2011).

I ROS sono molecole instabili e reattive prodotte dal normale metabolismo energetico e un loro accumulo porta a gravi alterazioni a carico delle macromolecole cellulari quali perossidazione lipidica, perdita dell'integrità della membrana plasmatica, denaturazione delle proteine e danni a carico degli acidi nucleici.

L'incremento della produzione di queste specie chimiche è legato ad un aumento della concentrazione di Ca²⁺ all'interno della matrice mitocondriale in quanto è in grado di stimolare l'attività di vari complessi enzimatici Ca²⁺-dipendenti coinvolti nella catena respiratoria, ciò si traduce in un aumento del flusso di elettroni e della domanda di ATP che a loro volta facilitano la sintesi dei ROS (Gonzales *et al.*, 2003; Cortassa *et al.*, 2004).

Un incremento del danno ossidativo e un'alterazione delle reazioni redox sono scatenati anche da mutazioni che provocano una *loss of function* a carico della SOD1 che non essendo più in grado di detossificare lo O₂⁻ ne provoca l'accumulo con conseguente citotossicità e questo reperto è stato largamente documentato nei campioni prelevati da pazienti con SLA (Carrì *et al.*, 2015).

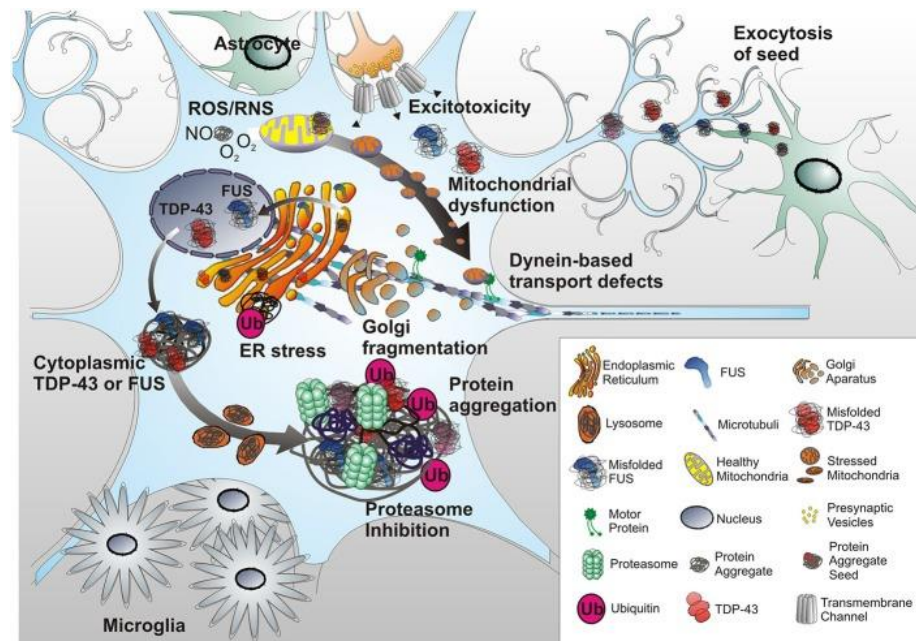


Figura 7. Rappresentazione che riassume i principali meccanismi molecolari sopracitati (Anjoscha e Sareen, 2015).

3. LE CELLULE COINVOLTE NELLA SLA

3.1 I motoneuroni

I neuroni motori, o motoneuroni (MN), rappresentano una popolazione di cellule neuronali presenti nel sistema nervoso centrale (SNC) che hanno la funzione di trasmettere gli impulsi motori alla periferia del corpo controllando i movimenti volontari quali la contrazione muscolare, la respirazione e altre attività vitali.

Sono distinguibili in due tipologie: i MN superiori o primari si originano dalla corteccia cerebrale e i loro assoni si prolungano verso la parte inferiore del corpo formando un fascio di fibre che raggiungono i MN secondari trasmettendo l'impulso elettrico.

I MN inferiori sono localizzati a livello del tronco encefalico e del midollo spinale, essi rappresentano una sorta di "ponte" in quanto sono collegati da un lato ai MN superiori e dall'altro alle fibre muscolari formando la placca motrice di conseguenza consentono di far giungere il segnale al muscolo.

In generale i MN sono i tipi cellulari primariamente coinvolti nello sviluppo della SLA anche se non tutti i sottotipi sono interessati nella stessa misura (Frey *et al.*,2000).

I MN inferiori sono cellule di grandi dimensioni con assoni molto lunghi e numerose arborescenze, e di conseguenza richiedono un maggiore metabolismo energetico, un adeguato funzionamento mitocondriale e un efficiente trasporto assonale per garantire livelli adeguati di sintesi proteica (Ferraiuolo *et al.*,2011).

Varie caratteristiche rendono i MN più vulnerabili rispetto ad altri gruppi neuronali, essi infatti esprimono elevati livelli dei recettori per il Ca^{2+} , il che li rende più suscettibili all'effetto eccitotossico e a deregolazioni dell'omeostasi di questo ione. Unitamente a ciò esprimono in misura inferiore le proteine implicate nel *buffering* e nel riequilibrio delle concentrazioni intracellulari del Ca^{2+} (William *et al.*, 1997).

Inoltre questi MN mostrano una ritardata risposta protettiva mediata dalle *heat shock protein*, sono più sensibili allo stress del reticolo endoplasmatico (RE) e sono più predisposti a danni ossidativi (Saxena *et al.*, 2009).

3.2 Gli astrociti

Sebbene i MN siano le cellule maggiormente implicate nella patogenesi della SLA, ci sono numerose evidenze che testimoniano un ruolo molto importante anche delle cellule gliali e in particolare degli astrociti.

Le cellule gliali, o nevroglia, sono cellule accessorie che, assieme ai neuroni, costituiscono il tessuto nervoso in cui rappresentano la frazione preponderante. Infatti il loro numero supera di circa 5 volte quello dei neuroni. Svolgono funzioni nutritive regolando i fluidi che circondano i neuroni e le sinapsi, fungono da supporto e sostegno, producono molecole in grado di influenzare la crescita degli assoni, assicurano l'isolamento e la protezione dei tessuti nervosi. Gli astrociti rappresentano la popolazione cellulare prevalente della nevroglia, e il loro nome deriva dal fatto che le loro estroflessioni citoplasmatiche gli conferiscono una morfologia che ricorda quella di una stella. Rappresentano i "mattoni" strutturali della barriera ematoencefalica infatti grazie ai loro prolungamenti sono in grado di prendere contatto con i vasi sanguigni che irrorano il SNC, e creare intorno ad essi uno strato protettivo e fortificante fondamentale per rendere altamente selettivi i vasi di questa regione. Unitamente a ciò gli astrociti sono in grado di regolare la vasocostrizione e la vasodilatazione producendo sostanze come l'acido arachidonico i cui metaboliti sono vasoattivi.

Gli astrociti, dal momento che fungono da impalcatura, sono implicati anche nello sviluppo cerebrale, in quanto dirigono la migrazione dei neuroni dai loro siti di origine alla loro sede finale durante lo sviluppo del SNC.

Gli astrociti giocano un ruolo fondamentale anche nella conservazione della fisiologia cerebrale partecipando al metabolismo dell'acido γ -amminobutirrico (GABA) e del glutammato.

Infatti questi neurotrasmettitori, dopo essere stati liberati durante la trasmissione sinaptica, vengono rimossi e trasportati negli astrociti in cui vengono demoliti e convertiti in glutamina che servirà successivamente per la sintesi di altri neurotrasmettitori.

Inoltre regolano la concentrazione ionica extracellulare in modo da creare e mantenere un gradiente idoneo alla sopravvivenza e alla corretta funzionalità dei neuroni.

Si tratta di cellule elettricamente non eccitabili in quanto a seguito della depolarizzazione non sono in grado di originare alcun potenziale di azione. Tuttavia possono essere “eccitati” da variazioni locali e transienti della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , il che causa il rilascio e l'*uptake* di varie molecole, processo denominato gliotrasmissione.

Gli astrociti di norma si trovano in uno stato quiescente tuttavia sono in grado di rispondere in qualsiasi momento a molte forme di danno quali traumi, infezioni, ischemia e processi neurodegenerativi mettendo in atto un processo noto come astrogliosi reattiva che consiste in un aumento anomalo del numero di tali cellule e questo favorisce la degenerazione e la morte dei MN.

Gli astrociti reattivi sono iperproliferanti, caratterizzati da ipertrofia cellulare e da un'alterata espressione di varie proteine quali proteasi, fattori di crescita e citochine pro-infiammatorie (Eddlestone *et al.*,1993).

L'astrogliosi si verifica in tutte le maggiori malattie neurodegenerative suggerendo che sia un meccanismo aspecifico delle cellule gliali per far fronte ad un danno neuronale, e spesso non è considerato come un elemento patogenetico primario. Tuttavia, recenti evidenze indicano che nella SLA gli astrociti influenzano il decorso della malattia e che rappresentano un potenziale bersaglio terapeutico (Vargas e Johnson,2010).

Le alterazioni funzionali degli astrociti nella SLA sono molteplici. In primo luogo, è stato evidenziato un deficit nel trasporto del glutammato a causa della minore espressione del trasportatore EAAT2, di conseguenza non potendo essere rimosso, il neurotrasmettitore si accumula nello spazio inter-sinaptico provocando un danno eccitotossico nei MN (Rothstein *et al.*, 1990). La sotto-espressione del trasportatore del glutammato è stata spiegata con la presenza del relativo mRNA in forma aberrante a causa di un errore nel processo di *splicing*, ma anche con reazioni ossidative che ne favoriscono l'inattivazione (Trotti *et al.*,1999).

Gli astrociti influenzano la sensibilità dei MN al glutammato anche attraverso un altro meccanismo: l'AMPA (α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo-propionato) è un recettore

ionotropico per il glutammato e la sua permeabilità al Ca^{2+} dipende dalla subunità GluR2 la quale, se presente, blocca la permeazione dello ione.

Normalmente gli astrociti inducono una sovra-regolazione di GluR2 che protegge i neuroni dal danno eccitotossico mentre nei MN, in genere, e in quelli esperimenti la SOD1 mutata, in particolare, questa subunità viene sotto-regolata aumentando così la sensibilità dei MN al danno da glutammato (Van Damme *et al.*,2007).

In conclusione, negli ultimi anni si sono accumulate molte evidenze che gli astrociti possano svolgere un ruolo primario nella patogenesi della SLA mediante effetti *in-trans* sui MN, probabilmente attraverso meccanismi che coinvolgono una deregolazione astrocitaria del Ca^{2+} .

4. IL SIGNALING E L'OMEOSTASI DEL CALCIO

4.1 Il Ca^{2+} come importante mediatore intracellulare

Lo ione calcio (Ca^{2+}) rappresenta un secondo messaggero intracellulare estremamente importante in quanto trasmette i segnali chimici ed elettrici provenienti dall'esterno, e ne media la conversione in informazioni necessarie per orientare l'attività di molecole e meccanismi di trasduzione del segnale all'interno delle cellule.

Il suo ruolo biologico dipende dal tipo di cellula, ma in ogni caso esso controlla molti momenti cruciali del ciclo cellulare come la proliferazione, il differenziamento e la morte.

Nelle cellule neuronali il flusso di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica e tra i compartimenti sub-cellulari regola importanti meccanismi biologici quali la crescita, la sinaptogenesi, la trasmissione degli impulsi, la plasticità neuronale e la sopravvivenza cellulare.

In condizioni fisiologiche di riposo, la concentrazione di Ca^{2+} nel citosol varia da 10^{-8} e 10^{-7}M , mentre nell'ambiente extra-cellulare è notevolmente superiore e pari a circa 10^{-3}M . Ciò significa che tra dentro e fuori la cellula c'è un gradiente che differisce dell'ordine di 10^{-4} - 10^{-5} volte, a seconda del tipo cellulare.

Questo differenziale viene mantenuto costante grazie a proteine di *buffering* (cioè in grado di legare il Ca^{2+} con varia affinità) e a proteine, o complessi multi-proteici, presenti sulla membrana plasmatica e su quella dei compartimenti intra-cellulari, capaci di rimuovere lo ione dal citoplasma, estrudendolo nell'ambiente esterno o sequestrandolo all'interno di organelli che lo immagazzinano come fonte di riserva e/o lo utilizzano per il proprio metabolismo.

Tuttavia, in presenza di impulsi elettrici o stimoli di natura chimica, questa proporzione varia temporaneamente generando delle differenze di concentrazione che si traducono in segnali i quali perdurano finché non viene ristabilito il rapporto iniziale: quindi, il ruolo del Ca^{2+} come messaggero deriva proprio dalla capacità delle cellule di controllare finemente, nello spazio e nel tempo, variazioni, anche minime e brevi, della concentrazione dello ione.

I mitocondri giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} in quanto sono in grado di immagazzinare una grande quantità di Ca^{2+} all'interno della matrice che, in presenza di fosfato inorganico, precipita sotto forma di depositi di idrossiapatite senza aumentare la concentrazione osmotica oltre un livello tale da causare un danno.

Tali depositi permettono di regolare e attivare vari enzimi coinvolti nel ciclo di Krebs, tra cui alcune deidrogenasi e l'ATP sintasi, quindi consentono di regolare la produzione di energia.

Il Ca^{2+} mitocondriale, inoltre, influenza il *signaling* intracellulare spazio-temporale e risulta determinante per la morte o la sopravvivenza cellulare.

Tuttavia, quando i mitocondri accumulano un'eccessiva quantità di Ca^{2+} , si innesca un circolo vizioso che causa alterazioni della funzionalità mitocondriale, produzione di radicali liberi e rilascio di fattori pro-apoptotici nel citosol.

Il reticolo endoplasmatico (RE) è un altro elemento cruciale nel *signaling* del Ca^{2+} : esso infatti rappresenta uno dei principali compartimenti in cui lo ione viene sequestrato e accumulato come fonte di riserva.

Non sorprende, pertanto, che in modelli $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ di SLA sia stata riscontrata una dilatazione anomala del RE rugoso, con distacco dei ribosomi e frammentazione delle cisterne, e depositi di materiale amorfo costituito da aggregati di proteine non correttamente ripiegate nel lumen dell'organello.

I mitocondri e il RE sono interconnessi attraverso delle giunzioni che influenzano la loro distribuzione reciproca, la trasduzione del segnale e le vie biosintetiche, e hanno inoltre un ruolo fondamentale nella mediazione e nella propagazione del *signaling* del Ca^{2+} tra i due organelli (Csordás e Hajnóczky, 2009). Esiste pertanto un *cross-talk* dinamico e interattivo implicato nella generazione dei segnali mediati da questo ione che prende il nome di *ER-mitochondria calcium cycle* (ERMCC).

Esistono varie vie di regolazione del Ca^{2+} , costituite principalmente da canali ionici e altri trasportatori trans-membrana, quali scambiatori e pompe ATP-dipendenti, situati nella

membrana plasmatica, nel RE e nei mitocondri, che hanno *pattern* di espressione diversi a seconda del tipo cellulare, dello stadio di sviluppo e di segnali fisio-patologici.

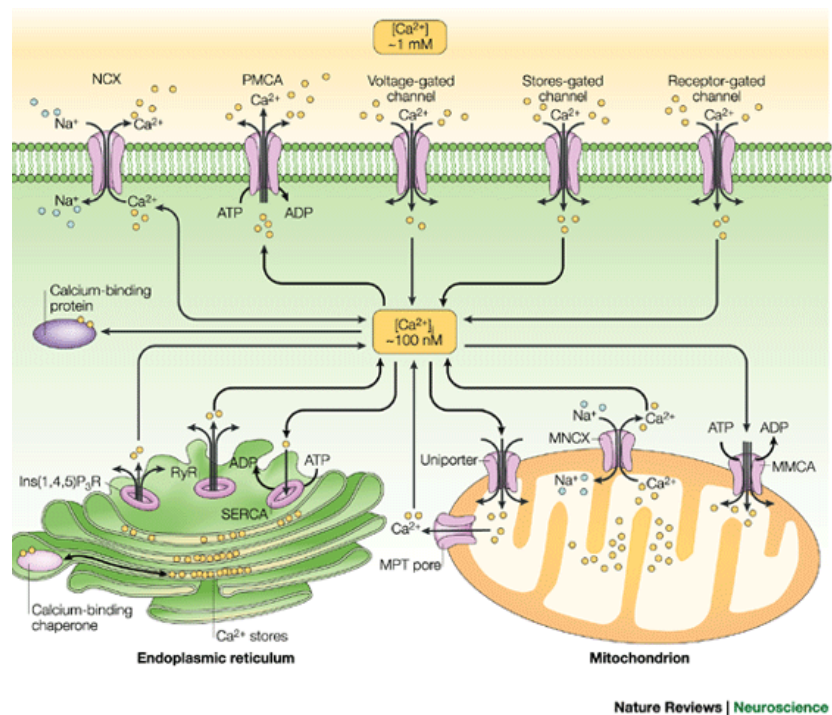


Figura 8. Immagine che illustra i principali trasportatori del Ca^{2+} (Syntichaki e Tavernarakis, 2003).

4.2 I sistemi di trasporto del Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica

La membrana cellulare è dotata di molteplici meccanismi che favoriscono sia l'entrata che l'uscita dello ione, come descritto nel seguito.

Per quanto riguarda l'*uptake*, a livello della membrana plasmatica sono presenti dei canali ionici ossia delle proteine che formano pori acquosi in grado di promuovere l'entrata (talvolta anche selettiva) del Ca^{2+} dall'ambiente esterno. Essi differiscono in base al tipo di stimolo che ne regola la transizione dallo stato chiuso allo stato aperto.

I canali voltaggio-dipendenti o *Voltage Operated Ca^{2+} Channels* (VOCCs) mediano l'influsso di Ca^{2+} a seguito di un cambiamento del potenziale di membrana e giocano un ruolo cruciale nella generazione e nella propagazione dell'impulso nervoso e nell'omeostasi cellulare, essendo abbondantemente espressi in tutte le cellule eccitabili.

I canali ligando-dipendenti o *Receptor Operated Ca^{2+} Channels* (ROCCs) richiedono invece il legame di una molecola agonista extra-cellulare per poter essere attivati; infatti grazie alla

loro interazione con l'agonista viene indotto un cambio conformazionale che provoca l'apertura del canale.

Infine, canali *Store-Operated Ca²⁺ Channels* (SOCCs) vengono attivati dallo svuotamento dei depositi di Ca²⁺ intracellulari e mediano l'ingresso dello ione dall'ambiente esterno grazie ad un meccanismo noto come *Store-Operated Calcium Entry* (SOCE).

Il SOCE è stato riconosciuto come una via essenziale dell'*uptake* del Ca²⁺ in molti tipi cellulari, in quanto regola e riequilibra la concentrazione del Ca²⁺ nella cellula, garantisce il rifornimento degli *stores* intracellulari e risulta fondamentale in vari processi biologici come l'esocitosi, l'attività enzimatica, la trascrizione genica e la proliferazione cellulare (Parekh *et al.*, 2003).

Il funzionamento molecolare dei canali coinvolti nel SOCE è stato delucidato solo recentemente: nel 2005 e nel 2006 differenti gruppi di ricerca hanno identificato le due classi di proteine che rappresentano i componenti essenziali di questo sistema ossia le *Stromal Interaction Molecules* (STIM) e le proteine della famiglia ORAI, il cui nome deriva dal custode delle porte del paradiso noto nella mitologia greca (Liou *et al.*, 2005).

STIM è presente in due isoforme: STIM1 (identificata in origine come un potenziale gene oncosoppressore codificante per una proteina transmembrana (Parker *et al.*, 1996)), ed un secondo gene ad essa correlato, STIM2.

La loro struttura è costituita da domini altamente conservati, in particolare è possibile individuare un singolo segmento transmembrana e una regione N-terminale rivolta verso il lumen del RE che comprende un dominio *EF-hand* che lega il Ca²⁺, e un dominio implicato nelle interazioni proteina-proteina che rappresentano i veri sensori del Ca²⁺ all'interno del RE.

Le proteine della famiglia ORAI sono proteine omo- o etero-tetrameriche le cui subunità si associano a formare il vero e proprio canale per il Ca²⁺ sulla membrana plasmatica.

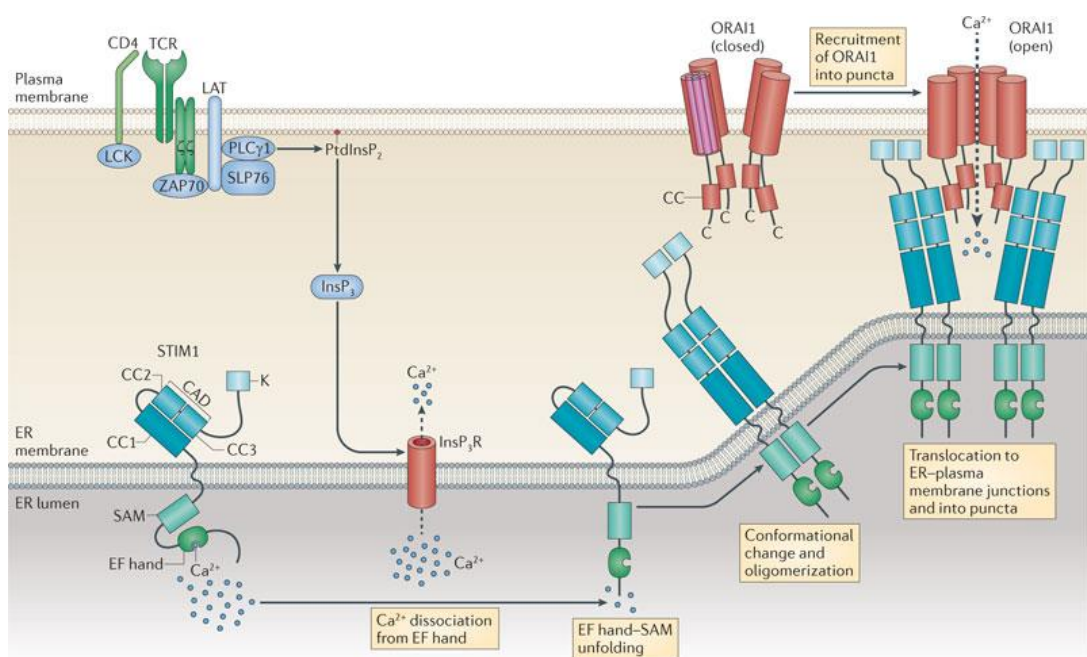
Sono note tre isoforme (ORAI1, 2 e 3) di cui la prima risulta più espressa negli astrociti, mentre la seconda nei neuroni.

Sono localizzate sui tubuli trasversi della membrana plasmatica e presentano una struttura con 4 domini transmembrana ad α -elica aventi entrambe le estremità rivolte verso il citosol, la regione C-terminale ha un dominio *coiled-coil* ed è responsabile del legame con STIM.

In condizioni di riposo il RE è carico di Ca²⁺ e le proteine STIM1 si trovano sparse sulla sua membrana risultando stabili grazie al legame con il Ca²⁺; tuttavia, quando si verifica un decremento della concentrazione endoluminale a seguito di uno stimolo che causa la

fuoriuscita dello ione dal RE si verifica il distacco del Ca^{2+} dall'*EF-hand* promuovendo l'oligomerizzazione e l'attivazione di STIM (Figura 9).

Gli oligomeri si aggregano concentrandosi in corrispondenza del punto che si interfaccia con ORAI, prendendo contatto con essa grazie al motivo *coiled-coil*: dalla loro interazione viene attivato il canale e l'influsso di Ca^{2+} proveniente dall'ambiente esterno attraverso ORAI. Successivamente, questo processo viene inibito non appena i livelli di Ca^{2+} nel RE tornano allo stato di riposo che corrisponde a circa 250-600 μM (Stathopoulos *et al.*, 2008; Liou *et al.*, 2007; Muik *et al.*, 2009).



Nature Reviews | Immunology

Figura 9. Meccanismo di funzionamento del SOCE (<http://www.nature.com/nri/journal/html>).

Per quanto riguarda i processi di efflusso del catione dalla cellula sono presenti vari sistemi molecolari che comprendono i sistemi di antiporto (o scambiatori) Ca^{2+} /cationi, che sfruttano l'energia generata dal co-trasporto di uno ione per mobilitare il Ca^{2+} fuori dalla cellula contro gradiente. Si tratta di trasportatori a bassa affinità che risultano particolarmente adatti a ristabilire depolarizzazioni transienti di Ca^{2+} , questo spiega la loro abbondanza nelle cellule eccitabili e il loro ruolo nel *signaling* neuronale. In tale contesto, l'antiporto principale è lo scambiatore $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (NCX) sulla membrana plasmatica, in grado di estrarre uno ione Ca^{2+} per l'entrata di 3 ioni Na^+ ed esiste in 3 isoforme che sono localizzate in differenti regioni del cervello.

Altri meccanismi di estrusione del Ca^{2+} dal citoplasma includono pompe ioniche quali le Ca^{2+} -ATPasi.

La *plasma-membrane Ca^{2+} ATPasi* (PMCA) è una proteina di 130 kDa che catalizza il trasporto del Ca^{2+} (contro gradiente) dal citoplasma allo spazio extra-cellulare attraverso un meccanismo ATP-dipendente. È una proteina ubiquitaria localizzata in tutti i tipi cellulari e a differenza degli scambiatori prima citati funziona in modo più efficiente e finemente regolato dal momento che ha un'elevata affinità per il Ca^{2+} , e dunque funziona anche a concentrazioni basali dello ione.

4.3 L'inflow e l'outflow del Ca^{2+} nel reticolo endoplasmatico

A livello del RE è presente una proteina fondamentale responsabile dell'entrata e dell'accumulo del Ca^{2+} all'interno dell'organello: si tratta della *sarco/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPases* (SERCA), una pompa ionica situata sulla membrana del RE che consente l'influsso nel lumen dell'organello di 2 ioni Ca^{2+} provenienti dal citoplasma per ogni molecola di ATP idrolizzata.

Nei mammiferi sono stati identificati tre geni che codificano per isoforme diverse ossia SERCA1, 2 e 3, che sono espresse in modo tessuto-specifico; tuttavia, ciascun trascritto è sottoposto a processi di *splicing* alternativo, il che aumenta ulteriormente il numero delle possibili varianti proteiche (Brini e Carafoli, 2009).

Una volta traslocato nel lumen, il Ca^{2+} viene sequestrato da specifiche proteine, quali calreticulina e calsequestrina, che instaurano legami a bassa affinità con lo ione consentendone uno scambio dinamico tra l'interno e l'esterno del RE.

Il dominio attuatore (A) regola l'apertura del canale, il dominio di fosforilazione (P) contiene il residuo Asp 351 che riceve il gruppo fosfato durante il ciclo catalitico e il sito di legame per i nucleotidi (N) che accoglie l'ATP (Toyoshima *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda il rilascio del Ca^{2+} dai depositi intracellulari confinati nel RE sono presenti due canali principali ossia il recettore della rianodina (RyR) e il recettore dell'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP_3R).

RyR è una proteina omo-tetramerica presente sulla membrana del RE, ha un peso molecolare di circa 550 kDa ed è presente in tre isoforme ma solo RyR-3 è espressa nel SNC.

Nei neuroni questo canale viene attivato in seguito ad un aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} (ad es. in seguito a depolarizzazione della cellula) e comporta il rilascio dello

ione dal RE, in un processo che viene definito “rilascio di calcio indotto da calcio”, o CICR (Nakai *et al.*, 1996).

L'IP₃R è invece un canale attivato dal legame con IP₃, un messaggero la cui produzione è mediata da una proteina G presente sulla membrana plasmatica che, grazie all'attivazione di una fosfolipasi, porta all'idrolisi dei fosfolipidi.

L'IP₃ si lega al suo recettore-canale sulla membrana del RE, attivandolo e promuovendo il rilascio dello ione nel citoplasma (Marshall & Taylor, 1994).

4.4 La traslocazione del Ca²⁺ nei mitocondri

Per quanto riguarda l'*uptake* di Ca²⁺ nei mitocondri, è bene precisare prima di tutto che la membrana esterna è permeabile a ioni e piccole molecole, mentre la membrana mitocondriale interna (MMI) non è permeabile agli ioni, e perciò richiede la presenza di specifici trasportatori.

Sulla MMI è infatti presente la molecola chiave che permette il rapido passaggio del Ca²⁺ attraverso la membrana interna, ossia il *mitochondrial Ca²⁺ uniporter* (MCU), che rappresenta la subunità-canale di un complesso proteico di recente identificazione (Figura 10).

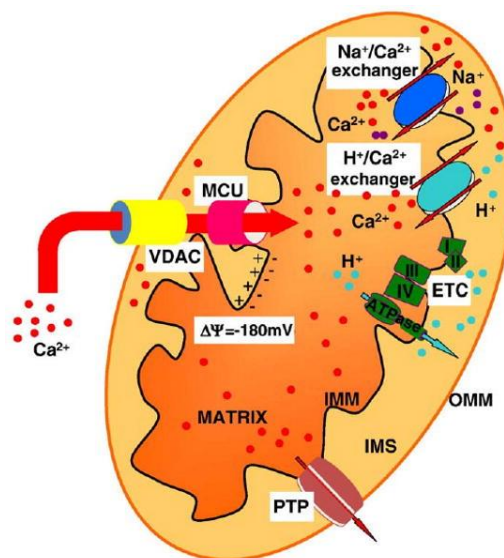


Figura 10. Illustrazione schematica dei trasportatori mitocondriali tra i quali MCU e PTP (Celsi *et al.*, 2009).

Gli esperimenti condotti negli ultimi anni hanno infatti dimostrato che MCU oligomerizza in corrispondenza della membrana mitocondriale interna formando un complesso molecolare di circa 480 kDa (Baughman *et al.*, 2011) il quale, sfruttando il gradiente elettrochimico che si

instaura nello spazio inter-membrana grazie all'attività della catena respiratoria, promuove l'ingresso di Ca^{2+} nella matrice senza consumo di ATP né il co-trasporto di altri ioni. Nel mitocondrio sono presenti anche vie di uscita del Ca^{2+} : nelle cellule non eccitabili l'efflusso di Ca^{2+} dalla matrice è mediato essenzialmente da scambiatori $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mentre nei neuroni e in altre cellule eccitabili è presente l'NCX mitocondriale (mNCX) che ha una funzione analoga allo scambiatore omonimo presente nella membrana plasmatica.

4.5 Deregolazioni nell'omeostasi del Ca^{2+} e malattie neurodegenerative

Il ruolo centrale del Ca^{2+} nel *signaling* neuronale sottolinea il suo ruolo centrale nelle malattie neurodegenerative, un gruppo eterogeneo di disordini caratterizzati da una perdita graduale, progressiva e selettiva di sistemi neuronali; a questa categoria appartengono, oltre alla SLA, il morbo di Alzheimer, la corea di Huntington e il morbo di Parkinson.

Nonostante l'ampio spettro di manifestazioni cliniche che contraddistinguono queste patologie le une dalle altre, esiste un'impressionante similarità nel meccanismo molecolare che in tutte queste malattie si risolve nella deregolazione del *signaling* e dell'omeostasi del Ca^{2+} (Zundorf e Reiser, 2011).

Questa situazione è associata ad alterazioni della capacità di tamponare le fluttuazioni della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare, a malfunzionamenti dei canali preposti al suo trasporto e a perturbazioni di altre proteine implicate nella regolazione del Ca^{2+} .

Oltre ad alterazioni della concentrazione citosolica dello ione, che determina un'errata regolazione di molti enzimi Ca^{2+} -dipendenti, di particolare rilevanza nella patogenesi delle suddette malattie sono soprattutto alterazioni del metabolismo del Ca^{2+} nel mitocondrio e nel RE. Tutto ciò porta ad un incremento dei livelli del catione all'interno delle cellule scatenando altre conseguenze deleterie quali fenomeni di eccitotossicità, alterazioni del metabolismo energetico e stress ossidativo che si risolvono con la morte neuronale.

Un sovraccarico di Ca^{2+} nel mitocondrio induce, ad es. l'attivazione di un canale presente nella membrana interna noto come *Permeability Transition Pore* (PTP). Vari studi hanno dimostrato che il PTP rappresenta un fattore chiave nel danno neuronale in quanto scatena una serie di effetti negativi, primo fra tutti l'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale interna con conseguente dissipazione del gradiente elettrochimico e disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa.

Ciò si traduce ovviamente in una riduzione della sintesi di ATP necessaria, tra l'altro, per il funzionamento delle pompe implicate nell'estrusione dal citosol del Ca^{2+} in eccesso (Icha *et al.*, 1998). L'apertura del PTP alimenta la produzione di ROS, in quanto favorisce l'uscita dal mitocondrio di molecole antiossidanti, quali il glutathione, diminuendo la capacità riducente dell'organello. Si verifica anche la perdita di alcuni componenti della catena respiratoria, provocando la perdita di elettroni che alimentano la produzione di ulteriori radicali liberi. Uno dei componenti della catena respiratoria che viene rilasciato all'esterno è il citocromo c, che – una volta rilasciato dal mitocondrio – attiva processi apoptotici. Esso è in grado di interagire con il recettore dell' IP_3 localizzato sul RE, causando un ulteriore rilascio di Ca^{2+} che va ad attivare specifiche proteasi, quali caspasi e calpaine, che sono direttamente responsabili della cascata apoptotica (Luetjens *et al.*, 2000).

Dal momento che esiste un *cross-talk* tra il RE e i mitocondri, le deregolazioni del Ca^{2+} che si verificano in un organello si possono ripercuotere anche sull'altro perché tra di essi avviene un continuo scambio reciproco: il Ca^{2+} rilasciato dal RE viene assorbito dai mitocondri che a loro volta lo trasportano nuovamente verso il RE, secondo un meccanismo è noto come *ER Mitochondria Calcium Cycle* (ERMCC). Una perturbazione dell'omeostasi del Ca^{2+} porta anche ad una situazione di stress a carico del RE, il quale manifesta distensione delle cisterne, distacco dei ribosomi, e formazione di materiale granulare amorfo nel lume che rappresentano chiari indicatori di disfunzioni nella sintesi e nel processamento delle proteine. Lo stress del RE si verifica quando il suo contenuto di Ca^{2+} viene alterato e si accumulano aggregati proteici nel comparto endoluminale, innescando la *Unfolded Protein Response* (UPR), al fine di degradare le proteine non correttamente ripiegate e di rallentare la sintesi proteica, in modo da ridurre il sovraccarico di proteine prone all'aggregazione (Lautenschlaeger *et al.*, 2012).

Tutti questi meccanismi mediati dal Ca^{2+} risultano ben documentati e descritti sia nei campioni prelevati da pazienti affetti da SLA, sia nei modelli murini e in diversi modelli cellulari *in vitro*.

4.6 Alterazioni dell'omeostasi del Ca²⁺ in astrociti spinali

Nel presente paragrafo verrà descritto brevemente l'approccio utilizzato e i risultati ottenuti nel lavoro sperimentale condotto precedentemente nel nostro laboratorio, in quanto essi sono strettamente correlati a quanto svolto in questo lavoro di tesi.

Nell'ambito della precedente sperimentazione è stato messo a punto per la prima volta un protocollo per la comparazione *in vitro* dei flussi locali del Ca²⁺ in colture primarie di astrociti spinali da topi SOD1^{G93A} e SOD1^{WT}. Ciò è stato realizzato utilizzando sonde luminescenti (*equorine*) e fluorescenti (*cameleon*) geneticamente ingegnerizzate per essere indirizzate a diversi domini cellulari, e permettere così di analizzare la concentrazione di Ca²⁺, e le sue fluttuazioni, nei vari distretti. Questo approccio ha permesso di evidenziare un maggiore ingresso di Ca²⁺ nel citosol di astrociti SOD1^{G93A} rispetto ai SOD1^{WT} in seguito all'attivazione del SOCE, suggerendo per la prima volta una correlazione tra l'espressione della forma mutata della SOD1 e una sovra-regolazione di SOCE e dei livelli cellulari di Ca²⁺.

A dispetto di questo maggiore ingresso di Ca²⁺ nel citosol, in seguito all'attivazione del SOCE non sono state riscontrate differenze significative nell'ingresso di Ca²⁺ nei mitocondri di astrociti SOD1^{G93A} rispetto ai SOD1^{WT}, suggerendo possibili difetti dei mitocondri SOD1^{G93A} nella loro capacità di tamponare sovraccarichi cellulari dello ione.

SCOPO DELLA TESI

Attualmente si sta facendo strada l'ipotesi di un probabile coinvolgimento degli astrociti nella patogenesi della SLA, e in particolare nella degenerazione dei MN, e che ciò sia legato ad una deregolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} in questa popolazione cellulare.

I risultati precedentemente ottenuti sui flussi locali di Ca^{2+} in astrociti primari spinali, confermano che un'alterazione dell'omeostasi dello ione potrebbe essere coinvolta nei presunti effetti *in-trans* degli astrociti sui motoneuroni nella SLA.

Alla luce di queste premesse, in questo lavoro di tesi è stata iniziata un'analisi volta a spiegare i meccanismi molecolari e cellulari alla base di alterazioni del metabolismo del Ca^{2+} negli astrociti SLA.

A tale scopo è stata avviata un'indagine comparativa sui livelli di espressione di importanti sistemi di mobilitazione del Ca^{2+} , mediante la tecnica del Western blot, in astrociti spinali primari derivati dal modello transgenico murino di SLA esprimente il mutante (G93A) di SOD1 e la loro controparte sana.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Modelli murini e genotipizzazione

In questo lavoro sperimentale sono state impiegate tre linee murine diverse le quali sono state ottenute dal Jackson Laboratory; in seguito verranno descritte brevemente:

1. B6SJLF1/J: si tratta di ibridi F1 derivanti dall'incrocio tra maschi SJL/J (SJL) e femmine C57BL/6J (B6) quindi sono individui eterozigoti a tutti i loci, assumendo che i ceppi parentali possiedano alleli differenti ai medesimi loci. I topi sono tutti genotipicamente e fenotipicamente uniformi.

2. B6SJL-Tg (G93A*SOD1)1Gur/J: questa linea, in seguito denominata come SOD1^{G93A}, esprime in emizigosi la forma mutante G93A della SOD1 umana; questo assetto genetico viene mantenuto incrociando un maschio transgenico con una femmina B6SJLF1/J.

I topi possiedono un elevato numero di copie del transgene ed esprimono alti livelli della proteina corrispondente.

Gli emizigoti sviluppano un fenotipo simile alla SLA, in particolare dopo circa 90 giorni di età mostrano debolezza muscolare, tremori, trascinarsi degli arti inferiori e perdita di coordinazione nei movimenti.

La malattia progredisce con visibile peggioramento a causa della perdita di MN spinali infatti dopo circa 120-150 giorni i topi evidenziano una paralisi completa di uno o più arti e non sono in grado di girarsi da soli quando vengono riposti su un fianco (Heiman-Patterson et al., 2005).

3. B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J: questa linea transgenica, in seguito indicata come SOD1^{WT}, porta l'allele normale o wild type della SOD1 umana in condizione di emizigosi.

Il livello di espressione proteica è il medesimo di quello riscontrato nei topi SOD1^{G93A} sebbene il numero di copie del transgene sia inferiore.

I topi non evidenziano alcun sintomo clinico associabile alla SLA e vengono impiegati come controlli negli studi comparativi.

Tutti gli animali sono stati allevati e mantenuti dal personale tecnico dello stabulario nord SPF del complesso Vallisneri nel rispetto dei principi della normativa europea sul benessere degli animali utilizzati a fini sperimentali (Decreto legge 26/2014).

Incrociando un topo SOD1^{G93A} o SOD1^{WT} con una femmina B6SJLF1/J si ottiene una progenie in cui solo il 50% dei topi porta il transgene in singola copia quindi per selezionarli è necessario

procedere alla loro genotipizzazione mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) che viene eseguita usando il kit *Mouse Genotyping* (KAPA).

L'estrazione del DNA genomico viene effettuata a partire da campioni di tessuto prelevati dal personale competente, successivamente è prevista una fase preliminare di lisi per favorire la rottura delle cellule, la fuoriuscita del DNA e la degradazione di nucleasi e proteine contaminanti.

Per ciascun campione si prepara una provetta con i seguenti reagenti:

- *KAPA Express Extract Protease*: 2µL
- *KAPA Express Extract Buffer* per attivare l'enzima: 10µL
- H₂O milliQ per portare ad un volume finale di 100µL

Dopodiché i campioni vengono incubati prima a 75°C per 10 minuti, in modo da favorire l'azione della proteasi, e poi a 95°C per 5 minuti per inattivarla, successivamente si centrifuga a 200Xg e si recupera il surnatante che verrà utilizzato in seguito.

Successivamente si allestiscono i tubi da PCR sempre con i reagenti forniti dal *KAPA Mouse Genotyping Kit*. Per ciascuna reazione di PCR si prepara una eppendorf aggiungendo:

- KAPA mix contenente DNA polimerasi, *buffer* di reazione con *loading dye*, dNTPs e MgCl₂: 10µL
- Coppia *primer 1* che amplifica un frammento di 236 pb del transgene codificante per la SOD1 umana (25µM per il *Forward* e 25µM per il *Reverse*) la cui sequenza è la seguente:

Tg-Forward: 5' - CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA -3'

Tg-Reverse: 5' - CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA -3'

- Coppia *primer 2* che amplifica un frammento di 324 pb del gene per l'interleuchina-2 il quale viene utilizzato come controllo per monitorare l'efficienza della reazione (25µM per il *Forward* e 25µM per il *Reverse*) la cui sequenza è la seguente:

Forward: 5' - CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT - 3'

Reverse: 5' - GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C - 3'

- H₂O milliQ per portare ad un volume finale pari a 19µL
- DNA estratto dalla lisi dei campioni: 1µL

Dopo aver preparato la mix di reazione, le provette vengono inserite nel termociclatore per la fase di PCR impostando prima uno step di denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti e poi il seguente protocollo termico per ciascuno dei 35 cicli di reazione:

- ❖ Denaturazione: 30 secondi a 95°C per favorire la separazione del *double strand* di DNA;

❖ *Annealing*: 15 secondi a 62°C per consentire ai *primers* di appaiarsi alle regioni complementari;

❖ Estensione: 45 secondi a 72°C in modo da favorire l'attività della DNA polimerasi.

Infine si esegue uno step di estensione finale a 72°C per 2 minuti per massimizzare l'attività della polimerasi.

Il DNA amplificato viene analizzato mediante elettroforesi: si tratta di una tecnica che consente la migrazione e la separazione di molecole elettricamente cariche all'interno di una matrice semisolida e porosa immersa in un fluido per effetto di un campo elettrico creato da una coppia di elettrodi con carica opposta.

Per separare i frammenti di DNA in genere si utilizza un gel di agarosio che corrisponde ad un polimero caratterizzato da un comportamento differente in base alla temperatura a cui viene sottoposto. Esso infatti solubilizza alla temperatura di ebollizione mentre tende a solidificare man mano che si raffredda formando un gel con una porosità che varia in base alla sua concentrazione, quindi origina una sorta di setaccio molecolare attraverso il quale migreranno le molecole di DNA.

Per preparare un gel di agarosio al 2% è necessario prima pesare 2g di agarosio in polvere e versarli in una beuta, in seguito si aggiungono 100 ml di Tris-Borato-EDTA (TBE) e il tutto viene riposto in un microonde per far sciogliere completamente l'agarosio.

Dopodiché si lascia in agitazione per qualche minuto e poi si aggiunge l'intercalante ossia una molecola in grado di disporsi tra le coppie di basi azotate adiacenti e impilate rendendo possibile la visualizzazione degli ampliconi grazie al fatto che emette fluorescenza verde se esposto a raggi UV. Esistono varie tipologie di intercalante ma nel nostro caso abbiamo utilizzato il DNA *staining* G (SERVA).

Successivamente si cola nella camera di corsa dopo aver inserito i relativi pettinini necessari per creare i pozzetti in cui verranno caricati i campioni di DNA.

Una volta solidificato, il gel viene ricoperto con tampone di corsa TBE e dopo aver rimosso i pettinini si caricano 10µL di DNA, infine si applica un voltaggio di 100 Volt per 30 minuti.

Le molecole di DNA, avendo una carica netta negativa dovuta alla presenza dei gruppi fosfato, migreranno verso l'anodo carico positivamente perciò frammenti di lunghezza differente si muoveranno nel gel con velocità diversa, di conseguenza sarà possibile separare i frammenti più piccoli da quelli con un peso molecolare maggiore.

La foto che segue rappresenta la visualizzazione al transilluminatore di uno dei gel che abbiamo allestito: la presenza di due bande indica che il topo da cui è stato estratto il DNA porta il transgene della SOD1 umana, mutata o WT, mentre una singola banda indica l'amplificazione del controllo interno positivo e l'assenza del gene esogeno (Figura 14).

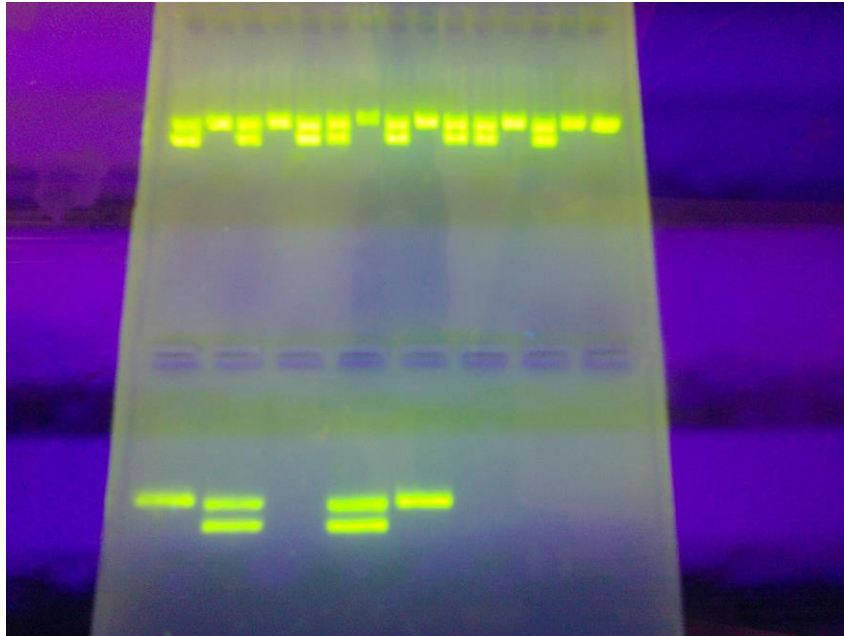


Figura 11. Immagine di un gel dopo elettroforesi in gel di agarosio.

5.2 Colture di astrociti primari

Dopo essere stati genotipizzati, i topi che possiedono il transgene vengono utilizzati per allestire le colture di astrociti primari.

I neonati (1-2 giorni di vita) vengono sacrificati mediante decapitazione con delle forbici affilate; dopodiché si procede eseguendo un'incisione lungo il dorso in modo da poter rimuovere la pelle ed esporre il rachide il quale poi viene prelevato e riposto in una piastra Petri contenente una soluzione fredda di Sali di Hanks necessaria per preservare l'integrità cellulare.

Lo step seguente consiste nell'estrazione del midollo spinale e questa operazione va eseguita con l'aiuto di uno stereo-microscopio per individuare con precisione il canale vertebrale.

Poi, grazie ad una siringa munita di ago, si inietta della soluzione Sali di Hanks (Sigma) alla base del rachide in modo da esercitare una pressione idrodinamica che consente la fuoriuscita del midollo spinale.

I midolli così ottenuti vengono prelevati e riposti in una piastra Petri vuota e una volta frammentati meccanicamente con una lametta si trasferiscono in una Falcon con 1,5 ml di Sali di Hanks per poi essere centrifugati a 200Xg per un minuto (min) in modo da ottenere il pellet di cellule.

Dopo aver eliminato il surnatante è prevista una serie di passaggi sequenziali così schematizzati:

- Il pellet viene risospeso in una soluzione di Sali di Hanks contenente collagenasi (0,25% p/V; Sigma) in modo da degradare il tessuto circostante e le strutture extracellulari, e dopo una breve incubazione a 37°C per 5 minuti, si centrifuga a 200Xg.
- Il surnatante viene nuovamente scartato, mentre il pellet si risospende in una soluzione di Sali di Hanks con DNasi (0,05% p/V) e centrifugato a 200Xg per 1 min.
- Successivamente il tessuto viene disgregato mediante una Pasteur di vetro dalla punta assottigliata.
- Per bloccare l'azione della DNasi si aggiungono 2ml di terreno di coltura composto da: *Minimal Essential Medium* (Euroclone) addizionato con siero fetale bovino (FBS, Euroclone) al 20% (v/v), glutammina (4Mm), glucosio all'1% (p/v), penicillina (100U/ml), streptomina (100µg/ml) e l'antimicotico fungizone al 1% (v/v).
- Infine la sospensione cellulare si centrifuga per 5 minuti a 200Xg e il pellet viene risospeso in terreno di coltura.

Le cellule vengono poi seminate in fiasche da 25cm² alla densità di circa 200.000 cellule/fiasca e si incubano in termostato a 37°C in presenza di CO₂ (5%).

Gli astrociti vengono mantenuti in coltura per circa 20 giorni cambiando il terreno tre volte a settimana il quale ha la stessa composizione di quello utilizzato per la semina iniziale ma con FBS al 10% inoltre, essendo privo di fattori neurotrofici, non viene favorita la crescita dei neuroni consentendo lo sviluppo pressoché esclusivo degli astrociti.

Dopo tre settimane, gli astrociti vengono staccati dalle fiasche con una soluzione di tripsina-ETDA e riseminati in piastre da sei pozzetti per i saggi di *Western blot* e in piastre da 24 pozzetti contenenti vetrini sterili per i saggi di immuno-citochimica.

5.3 Immuno-citochimica

La purezza della coltura primaria viene valutata attraverso un'analisi immuno-citochimica utilizzando anticorpi diretti contro una specifica proteina astrocitaria ossia la proteina fibrillare acida della glia (GFAP).

Dai pozzetti delle piastre multi-*well* viene eliminato il terreno, eseguiti due lavaggi con tampone fosfato (PBS) e i vetrini con le cellule adese sono fissati in PBS con paraformaldeide (PFA) al 2% (p/v) per 30 min a 4°C. Gli astrociti poi vengono permeabilizzati con Triton allo 0.1% in PBS (p/v) per 1h a temperatura ambiente in modo da favorire la penetrazione dell'anticorpo all'interno delle cellule.

In seguito i vetrini vengono lavati in PBS e incubati per 1 h a 37°C con l'anticorpo primario policlonale anti-GFAP (Dako) diluito 1:500 in PBS con BSA all'1% (p/v).

Successivamente si eseguono due lavaggi di 5 min ciascuno e i vetrini vengono incubati per 1h a 37°C con l'anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con la sonda fluorescente TRITC (Isotiocianato di tetrametilrodamina) (Dako) diluito in rapporto 1:100 in PBS con BSA all'1% (p/v).

Il TRITC è un fluoroforo in grado di emettere una fluorescenza di colore rosso-arancione a 573 nm quando assorbe onde elettromagnetiche ad una lunghezza d'onda di 557 nm.

Questo anticorpo, riconoscendo in modo specifico il complesso anticorpo primario-GFAP, permette di visualizzare le regioni in cui è localizzata la proteina astrocitaria bersaglio.

Per poter discriminare e numerare le cellule presenti nel vetrino si utilizza anche un secondo tracciante a bersaglio nucleare ossia l'Hoechst 33342 (5µg/ml, Sigma) il quale è in grado di legarsi al solco minore del DNA mettendo così in evidenza il nucleo; esso emette luce blu a 461 nm quando assorbe luce ultravioletta a 350 nm.

I vetrini vengono incubati a temperatura ambiente per 15 minuti e mantenuti al buio, dal momento che il colorante è fotosensibile; infine vengono lavati e montati su vetrini porta-oggetto mediante la soluzione di montaggio [8% Mowiol (Sigma) in glicerolo e PBS (1/3 v/v)]. Infine si osservano al microscopio a fluorescenza (Leica CTR6000) e si acquisiscono le immagini attraverso digitalizzazione con una camera digitale (Orca flash 4.0) e con il software Leica Las AF Lite ed elaborate utilizzando il software ImageJ.

5.4 Preparazione del campione e quantificazione delle proteine

La fase preliminare di preparazione del campione è fondamentale per consentire la separazione successiva delle proteine e dipende dal tipo di campione, dalle caratteristiche delle proteine che si intendono analizzare ma anche dal protocollo sperimentale previsto per gli step seguenti.

Consiste nella lisi del campione, nell'estrazione delle proteine e nella loro simultanea denaturazione e solubilizzazione facendo in modo di mantenere inalterata la loro massa.

La denaturazione è necessaria per far perdere la struttura tridimensionale alle proteine e separare le varie catene polipeptidiche in modo che tutte si trovino nella stessa conformazione a gomitolo statistico infatti la struttura nativa può influenzare negativamente la mobilità elettroforetica.

La solubilizzazione invece è necessaria per mantenere in soluzione le proteine evitando fenomeni di precipitazione dovuti ad interazioni proteina-proteina indesiderate.

Nel nostro caso i campioni sono rappresentati dalle colture di astrociti primari SOD1^{G93A} e SOD1^{WT} allestite in piastre multiwell: dopo incubazione, il terreno viene eliminato e si eseguono due lavaggi con PBS freddo, successivamente grazie all'aiuto di uno *scraper* le cellule vengono rimosse dalla superficie dei pozzetti e riposte in una provetta per poi essere centrifugate a 200Xg per 5 min.

I pellet cellulari vengono risospesi in *Laemmli Sample Buffer* (LSB) costituito da Tris-HCl (62.5 mM) a pH 6.8, SDS (2%), glicerolo (10%) e addizionato con un cocktail di inibitori di proteasi (PIC, Roche), inoltre per ottimizzare la lisi delle cellule i campioni vengono bolliti per 5 min.

Preparato il campione, è necessario procedere alla quantificazione delle proteine totali di ciascun campione per i seguenti motivi: prima di tutto non si può caricare una quantità troppo elevata di proteine altrimenti non verrebbero separate bene e la risoluzione risulterebbe inferiore. Allo stesso tempo non devono essere presenti neanche in quantità troppo basse altrimenti non rientrerebbero nel *detection limit*, inoltre questa determinazione è fondamentale per riuscire a caricare la stessa quantità di proteine per ciascun campione in modo da renderli confrontabili.

La quantificazione è stata eseguita mediante il metodo dell'acido bicinconinico (BCA) il quale si basa su due reazioni accoppiate: la prima, chiamata reazione del Biureto, consiste nel far reagire la miscela proteica con un sale di rame in ambiente alcalino, in seguito si verifica la riduzione dello ione rameico (Cu²⁺) a ione rameoso (Cu⁺) il quale si lega alle proteine, di

conseguenza il complesso rame ridotto-proteina è proporzionale alla quantità di proteina presente nel campione.

Successivamente due molecole di BCA chelano uno ione Cu^+ dando origine ad una reazione colorimetrica grazie alla formazione di un composto viola-porpora la cui intensità dipende dalla concentrazione proteica. Di conseguenza eseguendo una determinazione spettrofotometrica a 540 nm è possibile risalire alla quantità di proteina presente in ciascun campione.

È necessario costruire una retta di taratura per poter eseguire una quantificazione relativa con una proteina standard a concentrazione nota ossia la sieralbumina bovina (BSA), ciò è possibile grazie all'allestimento di sei diluizioni seriali di BSA.

Il saggio è stato eseguito utilizzando il *BCATM Protein Assay Kit* della Pierce e seguendo le procedure descritte nel protocollo del kit.

In Figura 16 è illustrata la piastra dove è stato eseguito il test alla fine della procedura e pronta per essere letta allo spettrofotometro.

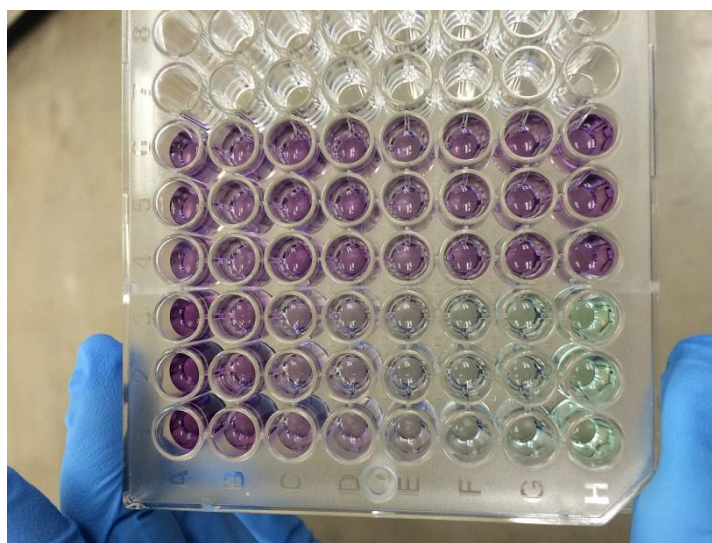


Figura 12. Possibile risultato ottenibile a seguito di un saggio BCA.

5.5 Western blot

Il *Western blot* è una tecnica utilizzata in biochimica e biologia molecolare che consente la separazione mediante elettroforesi di una miscela complessa di proteine in base al loro peso molecolare, il loro trasferimento su un supporto solido rappresentato da una membrana, il rilevamento e la visualizzazione della proteina di interesse utilizzando specifici anticorpi primari e secondari (Mahamood e Ping-Chan, 2012).

La prima fase consiste nell'elettroforesi monodimensionale eseguita utilizzando gel di poliacrilamide in presenza di Sodio Dodecil Solfato, tecnica definita come *Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE.)

I campioni di partenza corrispondono alle colture di astrociti primari preparati come descritto nel paragrafo precedente, successivamente i campioni vengono diluiti alla concentrazione desiderata con LSB addizionato con blu di bromofenolo in tracce e ditiotreitolo (DDT) 200Mm. L'SDS possiede molteplici funzioni infatti è sia un detergente, in quanto ha la capacità di solubilizzare le proteine di membrana, sia un potente denaturante grazie alla sua natura anfipatica che lo rende in grado di interferire con le interazioni elettrostatiche e con quelle idrofobiche andando così ad alterare la struttura tridimensionale delle proteine.

La molecola di SDS è formata da una parte apolare costituita da una coda idrofobica di dodici atomi di carbonio, e da parte polare costituita da un gruppo solfato con carica negativa.

La parte anionica della molecola si lega alle proteine in maniera stabile e con stechiometria fissa, in particolare una molecola ogni tre residui amminoacidici, e questo conferisce alle proteine una carica negativa netta proporzionale alla loro massa.

Il DDT invece corrisponde all'agente riducente il quale serve per rompere i ponti disolfuro in modo da denaturare definitivamente le proteine separando le catene polipeptidiche che costituiscono le proteine complesse a struttura quaternaria.

Per eseguire la separazione monodimensionale vengono utilizzati dei gel *precast* particolari costituiti da due regioni sovrastanti:

Lo *stacking gel*: si trova nella parte superiore e ha la funzione di impaccare e concentrare i campioni in modo tale che tutti comincino la migrazione dallo stesso punto di partenza.

Questo gel è costituito da un tampone a pH 6.8, acrilammide al 4% e bis-acrilammide, SDS, ammonio persolfato (APS) e TEMED che sono gli agenti polimerizzanti, glicina e acqua.

Il *separating gel*: si trova nella parte inferiore e ha la funzione di setaccio molecolare grazie al fatto che separa le proteine in base al peso molecolare; è costituito dalle stesse componenti dello *stacking* con la differenza che ha una concentrazione di acrilamide a gradiente che permette di separare proteine di differente peso molecolare inoltre è tamponato a pH 8.8.

Dopo aver allestito la camera elettroforetica e inserito i vetrini contenenti i gel, si rimuovono i pettini e si comincia a caricare nei pozzetti 25µL di campione ciascuno ad una concentrazione proteica pari a 1µg/µL.

Dopo questa operazione si riempie la camera fino a ricoprire i gel con il *running buffer* costituito da Tris-HCl a pH 8.4, glicina (192 mM), SDS (0.1%) e si imposta un amperaggio iniziale di 16mA che in seguito, non appena le bande supereranno lo stacking gel, verrà aumentato a 24mA per gel fino alla fine della corsa che, in genere, dura un'ora.

Nella seconda fase si esegue il "blotting" che consiste nel trasferimento delle proteine in modo speculare su una membrana con porosità di 0,45µm e dotata di carica positiva che la rende in grado di instaurare interazioni elettrostatiche con le proteine.

Per eseguire questo passaggio è necessario preparare il cosiddetto *sandwich*: in un supporto forato e dotato di molletta richiudibile si dispongono in serie una spugnetta, un foglio di carta assorbente, il gel, una membrana di polivinildenfluoruro (PVDF) (Millipore), un altro foglio di carta assorbente e una seconda spugnetta; infine si stende il tutto con un rullino per evitare la presenza di eventuali bolle.

Successivamente il supporto viene inserito con il giusto orientamento all'interno della cella adibita all'*immunoblotting* unitamente ad un contenitore con del ghiaccio in modo che il sistema non si surriscaldi durante questa operazione.

Dopodiché la camera viene riempita completamente con il *blotting buffer* costituito da Tris-HCl a pH 8.4, glicina (192 mM), metanolo (20%), SDS (0.03%), infine si richiude la camera applicando gli elettrodi e si imposta un amperaggio pari a 350 mA per un'ora.

Terminato questo periodo si preleva la membrana e si esegue una colorazione estemporanea con Comassie blu per verificare il corretto trasferimento delle proteine; si tratta di una tecnica rapida e reversibile in quanto il colorante può essere facilmente rimosso con lavaggi in metanolo inoltre non interferisce con le procedure di *immunodetection*.

Successivamente si eseguono due lavaggi in tampone Tris-Buffered Saline (TBS) per 5 minuti in agitazione e infine le membrane vengono lasciate immerse per un'ora in una soluzione saturante che agisce bloccando i siti aspecifici dal momento che, gli anticorpi, oltre ad instaurare legami con la proteina di interesse, possono interagire anche con la membrana.

In genere, si possono utilizzare due tipi di soluzione bloccante, una con BSA al 3% disciolta in TBS-Tween o in alternativa una soluzione a base di latte in polvere al 5%.

La terza fase consiste nell'identificazione immunologica delle proteine di interesse sfruttando la capacità degli anticorpi primari di riconoscere in maniera specifica gli antigeni verso cui sono diretti e quella degli anticorpi secondari di legarsi agli immunocomplessi.

È stato quindi aggiunto l'anticorpo primario e lasciato incubare a 4°C *overnight*; il giorno successivo, dopo due lavaggi di 15 min con TBS, è stato aggiunto l'anticorpo secondario e lasciato in agitazione per 1 ora, infine la membrana è stata lavata nuovamente con TBS.

Le bande immunoreattive vengono visualizzate mediante chemiluminescenza, usando il kit commerciale *Enhanced Chemi-Luminescence* (ECL) (Millipore). La perossidasi coniugata all'anticorpo secondario catalizza l'ossidazione del luminolo presente nel reattivo di ECL, promossa dall'acqua ossigenata, ed emette energia luminosa a 425 nm, rivelata attraverso un apparecchio [Kodak Imaging Station 440 CF] in grado di acquisire il segnale luminoso convertendolo in immagine digitale.

Gli anticorpi primari che abbiamo utilizzato negli esperimenti di *Western blot* sono stati i seguenti (tra parentesi la diluizione):

- anti SERCA: Anticorpo policlonale di capra (1:1000, Santa Cruz)
- anti MCU: Anticorpo policlonale di coniglio (1:1000, Sigma)
- anti STIM2: anticorpo policlonale di coniglio che riconosce la proteina Stim2 (1:2000) [#4123, Prosci]
- antiSTIM1: anticorpo monoclonale di topo sviluppato contro la sequenza aminoacidica 25-139 di STIM1[#610954, BD Transduction Laboratories™]
- anti ORAI1: anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la sequenza C-terminale della proteina ORAI1 (1:1000) [gentilmente fornito dal Dr. Veit Flockerzy, Homburg, Germany]

5.6 Analisi densitometrica

L'analisi densitometrica delle bande immunoreattive sulla membrana è stata condotta col software Kodak 1D. I valori di intensità derivano dalla somma delle intensità dei singoli pixel dell'area esaminata, per ogni banda di interesse, sottratta del background dell'area stessa. L'intensità delle bande è stata normalizzata alla quantità reale delle proteine totali caricate, determinata mediante analisi densitometrica dell'immagine della membrana colorata con Coomassie Brilliant blue e digitalizzata con lo scanner. Si sono ottenuti quindi valori relativi di intensità delle bande in unità arbitrarie, che permettono di confrontare e mediare i valori ottenuti con gel diversi.

RISULTATI

1.Valutazione della purezza delle colture di astrociti

La *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) rappresenta il componente principale dei filamenti intermedi citoscheletrici degli astrociti e svolge diverse funzioni quali il mantenimento della struttura cellulare, la regolazione della mitosi e della divisione cellulare. Il suo livello di espressione dipende da vari fattori come ormoni, citochine, lesioni e in particolare risulta sovra-regolata durante la proliferazione e il processo di espansione cellulare.

Dal momento che rappresenta il marker astrocitario per eccellenza, l'espressione della GFAP permette di valutare la purezza delle colture mediante tecniche di immuno-citochimica che prevedono l'utilizzo di un anticorpo primario diretto contro la proteina e di un anticorpo secondario coniugato ad una sonda fluorescente in grado di riconoscere l'immunocomplesso. Osservando al microscopio a fluorescenza è possibile contare direttamente le cellule e determinare la presenza di eventuali popolazioni contaminanti.

Il numero di astrociti (cellule positive alla GFAP) presente nelle diverse immagini acquisite è stato quindi rapportato al numero totale di cellule (nuclei totali), dal rapporto ottenuto è stato determinato che il grado di purezza in astrociti è superiore al 90% (Figura 11).

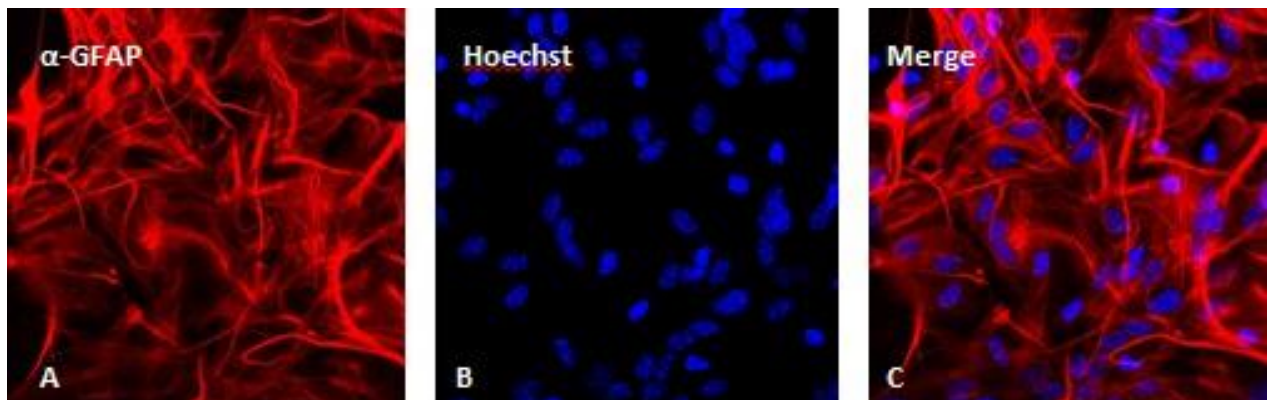


Figura 13. Valutazione della purezza delle colture di astrociti. Dopo 3 settimane in coltura, astrociti primari da midollo spinale di topo sono stati seminati su vetrino, fissati e immuno-marcati dapprima con un anticorpo diretto contro la GFAP e successivamente con un anticorpo secondario coniugato con il fluoroforo TRITC (segnale rosso, pannello A).

In seguito, le cellule sono state contro-marcate con il tracciante nucleare Hoechst 33342 che marca indistintamente tutte le cellule (segnale blu, pannello B).

La sovrapposizione delle due immagini (pannello C) evidenzia la presenza quasi esclusiva degli astrociti.

2. Analisi in *Western blot* dei componenti del SOCE

I risultati precedenti relativi alle misurazioni dei flussi del Ca^{2+} hanno dimostrato una sovra-regolazione dello *store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE) negli astrociti $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ rispetto alla controparte WT, con un incremento dei livelli dello ione sia nello spazio al di sotto della membrana plasmatica che nel comparto citosolico.

Per cercare di fornire una spiegazione dal punto di vista cellulare e molecolare sono stati condotti degli esperimenti volti ad individuare una possibile espressione differenziale di alcuni dei più importanti sistemi di regolazione dell'omeostasi dello ione, e in particolare delle proteine che costituiscono il sistema del SOCE.

ORAI è una famiglia di proteine transmembrana (ORAI 1,2, e 3) che formano il canale del Ca^{2+} che consente l'entrata capacitativa dello ione dall'ambiente extracellulare. La sua attivazione avviene in risposta alla deplezione di Ca^{2+} dal RE e dipende dall'interazione con gli oligomeri di STIM1 e STIM2 presenti a livello della membrana del RE i quali rappresentano i veri sensori della concentrazione luminale di Ca^{2+} .

Inizialmente è stato posto il focus nella valutazione del livello di espressione delle proteine ORAI1 (la più espressa in astrociti), STIM1 e STIM2 a partire dagli estratti proteici ottenuti da astrociti spinali primari $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ e da quelli di controllo SOD1^{WT} .

Dopo aver eseguito il gel SDS-PAGE e il *Western blot* con anticorpi specifici diretti contro ORAI1, è stata condotta l'analisi densitometrica delle bande immunoreattive.

Come mostrato in Figura 12, non ci sono differenze significative nell'espressione della proteina tra i due genotipi antagonisti.

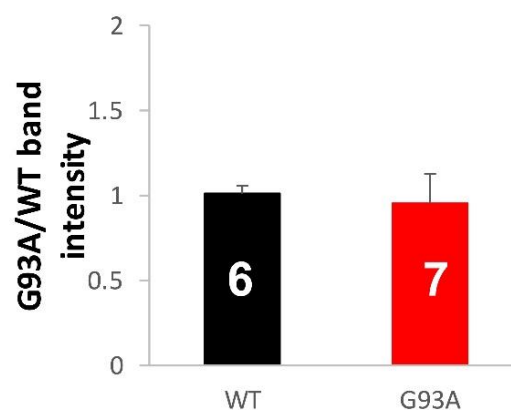
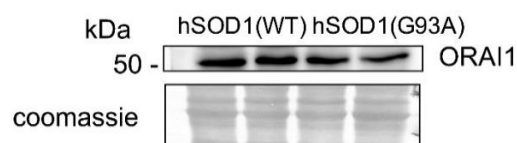


Figura 14. Nessuna differenza significativa nell'espressione di ORAI1 è evidente in astrociti spinali esprimenti il mutante SOD1^{G93A} (in rosso) o la controparte SOD1^{WT} (in nero). I lisati di astrociti sono stati analizzati mediante Western blot (WB) per l'espressione di ORAI1. Nel pannello superiore è riportato un WB rappresentativo di 2 campioni indipendenti per ciascuna condizione. Il diagramma a barre del pannello inferiore riporta invece l'analisi densitometrica delle bande immuno-reattive normalizzate alla densità ottica delle rispettive corsie colorate con il Coomassie blue (per la quantificazione delle proteine totali caricate in gel). I valori (media ± SEM) sono riportati come frazione del valore medio ottenuto con gli astrociti SOD1^{WT}. Il numero di replicati biologici indipendenti per ciascuna condizione è indicato all'interno della banda corrispondente.

Le altre proteine direttamente coinvolte nel SOCE prese in esame sono state STIM1 e STIM2: anche in questo caso i risultati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i due genotipi di SOD1 (Figura 13).

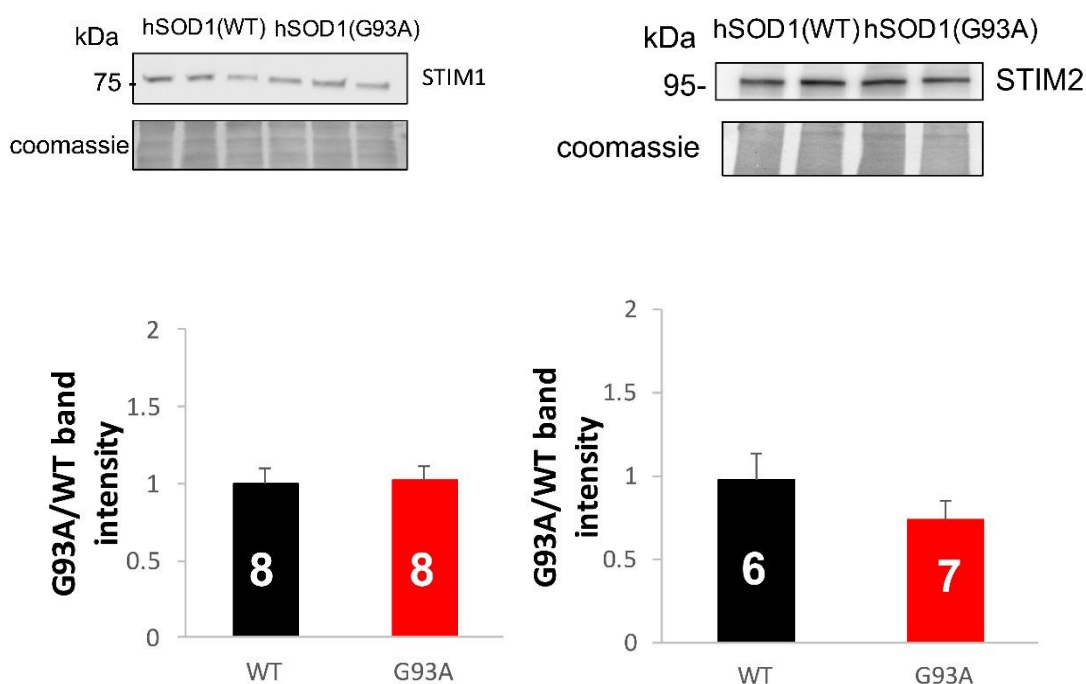


Figura 15. Nessuna differenza significativa nell'espressione di STIM1 e STIM2 è evidente in astrociti spinali esprimenti il mutante SOD1^{G93A} (in rosso) o la controparte SOD1^{WT} (in nero). I lisati di astrociti sono stati analizzati mediante WB per l'espressione di STIM1 (pannelli di sinistra) o STIM2 (pannelli di destra). Nei pannelli superiori sono riportati WB rappresentativi di almeno due campioni indipendenti per ciascuna condizione, mentre nei diagrammi a barre sono riportate le relative analisi densitometriche. Tutti gli altri dettagli sono come riportato nella legenda della Figura 14.

I risultati ottenuti suggeriscono che le differenze osservate nei flussi del Ca²⁺ in seguito ad attivazione del SOCE non siano da imputare ad un effetto della SOD1 mutante sui livelli di espressione dei principali protagonisti molecolari del SOCE negli astrociti.

I meccanismi che controllano l'immagazzinamento del Ca^{2+} nel RE sono fondamentali per l'omeostasi cellulare dello ione, e molti gravi disordini sono associati a disfunzioni di proteine di trasporto o di *buffering* del Ca^{2+} nel RE.

L'attenzione è stata successivamente focalizzata sull'analisi della SERCA. In questo caso, si tratta di una pompa ionica situata sulle membrane del RE preposta al trasporto attivo dello ione nel lumen dell'organello, e quindi la sua estrusione dal citosol.

Visto il coinvolgimento primario della SERCA nel "tamponare" variazioni transienti della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, e di regolare i livelli basali dello ione nel lumen del RE, e quindi – indirettamente – del SOCE, è stata presa in considerazione l'ipotesi di una probabile alterazione dei livelli di espressione della proteina negli astrociti $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$.

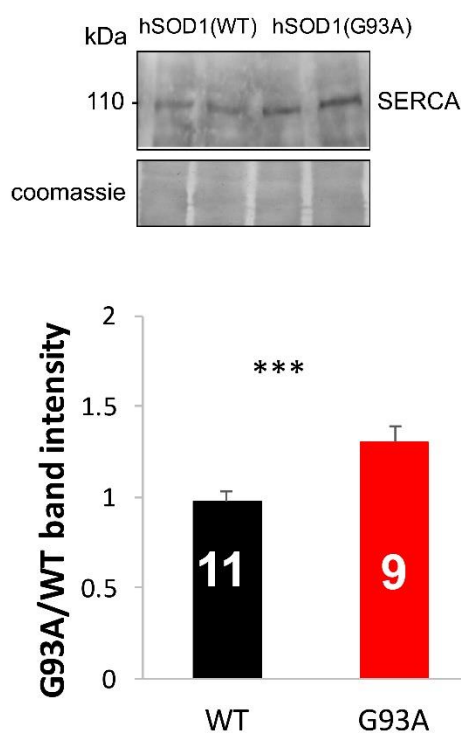


Figura 16. La Ca^{2+} -ATPasi SERCA è sovra-espressa in astrociti spinali esprimenti il mutante $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ (in rosso) rispetto alla controparte SOD1^{WT} (in nero). I lisati di astrociti sono stati analizzati mediante WB per l'espressione di SERCA, secondo le procedure descritte in precedenza. Tutti i dettagli sperimentali sono come riportato nella legenda della Figura 14.

*** $p < 0,001$ test-t Student.

Come riportato in Figura 14, la SERCA risulta sovra-espressa negli astrociti $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ rispetto ai controlli. Questo dato è abbastanza sorprendente.

Se da un lato, infatti, dimostra che l'espressione della SOD1 mutata può indurre alterazioni nel *pattern* di espressione dei sistemi di regolazione del Ca^{2+} , d'altra parte esso non riesce a

spiegare il fenotipo del SOCE osservato negli astrociti SOD1^{G93A}. Infatti, una sovra-espressione della SERCA dovrebbe, in teoria, garantire un maggior afflusso di Ca²⁺ nel RE, con conseguente abbassamento dei flussi citosolici dello ione. Essa, inoltre, dovrebbe aumentare i livelli di Ca²⁺ nel lumen del RE, diminuendo la sensibilità delle cellule all'attivazione del SOCE.

Sono possibili, tuttavia, altre spiegazioni che richiedono ulteriori approfondimenti sperimentali.

In primo luogo, è stato precedentemente dimostrato che l'espressione della SOD1^{G93A} induce una maggiore glutationilazione di STIM1 – dovuta ad un maggiore stress ossidativo – con conseguente deregolazione e aumento del SOCE (Kawamata *et al.*, 2014).

Incidentalmente, questa osservazione potrebbe concorrere, insieme alla maggiore espressione della SERCA da noi riportata, al sovraccarico di Ca²⁺ nel RE, e all'eccessivo rilascio dello ione dal compartimento in seguito a stimolazione, precedentemente descritti in astrociti SOD1^{G93A} (Kawamata *et al.*, 2014).

Inoltre, esistono altri sistemi che regolano i livelli di Ca²⁺ nel RE, inclusi trasportatori e proteine di *buffering* dello ione, i cui livelli di espressione andranno analizzati in futuro.

Un'ulteriore spiegazione della fenomenologia del SOCE osservata potrebbe coinvolgere alterazioni della capacità dei mitocondri di assorbire adeguatamente sovraccarichi citosolici di Ca²⁺. Il mitocondrio, infatti, è un altro organello fondamentale per il controllo generale dell'omeostasi del Ca²⁺ nelle cellule, e anch'esso – come il RE – funge da magazzino di riserva dello ione.

A fronte di un maggiore transiente di Ca²⁺ negli astrociti SOD1^{G93A} in seguito a stimolazione del SOCE, sarebbe pertanto prevedibile un corrispondente maggiore *uptake* dello ione nei mitocondri.

Sorprendentemente, nel precedente lavoro non sono state osservate differenze significative nei transienti mitocondriali di Ca²⁺ evocati dal SOCE tra astrociti SOD1^{WT} e SOD1^{G93A}.

Quest'apparente incapacità del mitocondrio – come sistema di *buffering* – di rispondere adeguatamente al SOCE potrebbe spiegare il maggiore transiente citosolico dello ione nel paradigma SOD1^{G93A}. Questa possibilità ha suggerito una possibile disfunzione del MCU (*mitochondrial Ca²⁺ uniporter*) che rappresenta l'unica via di entrata del Ca²⁺ nella matrice mitocondriale. Di conseguenza, nel presente lavoro sono stati analizzati i livelli di espressione della principale subunità canale del MCU (che comprende altre subunità accessorie di

regolazione). Tale analisi, tuttavia, non ha evidenziato differenze significative tra gli astrociti SOD1^{G93A} e la controparte di controllo (Figura 15).

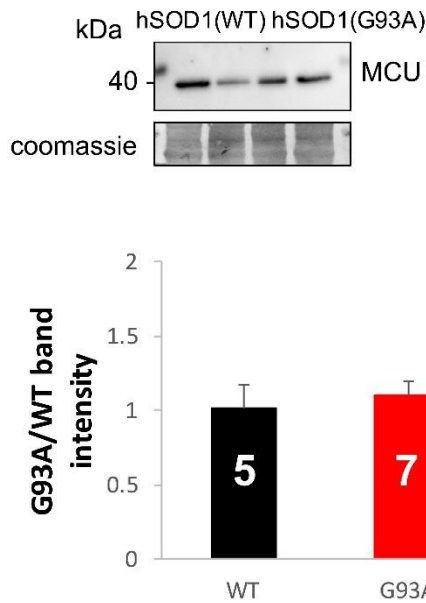


Figura 17. Nessuna differenza significativa nell'espressione del *mitochondrial Ca²⁺ uniporter* MCU è evidente in astrociti spinali esprimenti il mutante SOD1^{G93A} (in rosso) e la controparte SOD1^{WT} (in nero). I lisati di astrociti sono stati analizzati mediante WB per l'espressione di MCU, secondo le procedure descritte in precedenza. Tutti i dettagli sperimentali sono come riportato nella legenda della Figura 14.

Anche in questo caso, pertanto, i risultati ottenuti non sono in grado di giustificare, da un punto di vista molecolare, il complesso fenotipo correlato all'omeostasi locale del Ca²⁺ riscontrato negli astrociti SOD1^{G93A}. In questo contesto, sarà opportuno analizzare in dettaglio l'espressione delle altre subunità regolatorie del MCU, e gli scambiatori posti sulla membrana interna del mitocondrio deputati all'estrusione dello ione dall'organello.

Di particolare importanza, in questo contesto, sarà anche l'analisi di altri parametri funzionali e morfologici dei mitocondri, quali il potenziale di membrana mitocondriale, e la distribuzione cellulare del *network* dei mitocondri.

BIBLIOGRAFIA

- Abel EL. Football increases the risk for Lou Gehrig's disease, amyotrophic lateral sclerosis, 2007.
- Adelene Y. Tan, Todd R. Riley, Tristan Coady, Harmen J. Bussemaker, and James L. Manley; TLS/FUS (translocated in liposarcoma/fused in sarcoma) regulates target gene transcription via single-stranded DNA response elements, 2011.
- Anjoscha Kaus and Dhruv Sareen. ALS Patient Stem Cells for Unveiling Disease Signatures of Motoneuron Susceptibility: Perspectives on the Deadly Mitochondria, ER Stress and Calcium Triad, 2015.
- Ayala Youhna M, Zago P, D'Ambrogio A, Xu Ya-Fei, Petrucelli L, Buratti E and Baralle F. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43, 2008.
- Banci, L., Bertini, I., Boca, M., Girotto, S., Martinelli, M., Valentine, J. S., et al.; SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization, 2008.
- Barber S.C. and Shaw PJ; Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target, 2010.
- Bardo S, Cavazzini MG, and Emptage N. The role of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ store in the plasticity of central neurons, 2006.
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V & Mootha VK. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter, 2011.
- Beghi E, Logroscino G, Chiò A, Hardiman O, Mitchell D, Swingler R, Traylor B.J; Epidemiology of ALS and the role of population-based registries, 2006.
- Boille´ S, Vande Velde C and Cleveland D.W; ALS: A Disease of Motor Neurons Review and Their Nonneuronal Neighbors, 2006.

- Bradley WG, Mash DC; Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases, 2009.
- Brini M and Carafoli E. Calcium pumps in health and disease, 2009.
- Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, Rizzuto R. Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c): a critical evaluation, 1995.
- Büki A, Okonkwo D.O, Wang K.K, Povlishock J.T. Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury, 2000.
- Buratti E, Baralle FE; Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. Front Biosci 2008; Detailed review of normal function of TDP-43 and relationship to human disease.
- Buratti E, Dork T, Zuccato E, et al. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping, .2001
- Carrì MT, Valle C, Bozzo F, Cozzolino M; Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS, 2015.
- Castaldo P, Cataldi M, Magi S, Lariccia V, Arcangeli S, and Amoroso S. Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases, 2009.
- Celsi F, Pizzo P, Brini M, Leo S, Fotino C, Pinton P, Rizzuto R. Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration, 2009.
- Chio A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G; Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study; J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011.
- Chio A, Logroscino G, Hardiman O. Prognostic factors in ALS: A critical review. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2009.

- Csordas G and Hajno ́czky G. SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS, 2009.
- Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis, 1994.
- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP; Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase, 1993.
- Dmitry Lima, Bertoli A, Sorgato M.C, Moccia F. Generation and usage of aequorin lentiviral vectors for Ca²⁺ measurement in sub-cellular compartments of hard-to-transfect cells, 2016.
- Dorothee Dormann, Ramona Rodde, Dieter Edbauer, Eva Bentmann, Ingeborg Fischer, Alexander Hruscha, Manuel E Than, Ian RA Mackenzie, Anja Capell, Bettina Schmid, Manuela Neumann and Christian Haass; ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import, 2010.
- Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease, 1993.
- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ; Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis, 2011.
- Ferraiuolo Laura, Higginbottom Adrian, Paul R. Heath, Sian Barber, David Greenald, Janine Kirby and Pamela J. Shaw. Dysregulation of astrocyte–motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis, 2011.
- Foran E. and Trotti D; Glutamate Transporters and the Excitotoxic Path to Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2009.
- Forsberg K, Andersen PM, Marklund SL, Brännström T; Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis, 2011.

- Francesca Navone, Paola Genevini and Nica Borgese; Autophagy and Neurodegeneration: Insights from a Cultured Cell Model of ALS, 2015.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W and Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases, 2000.
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, and Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases, 2000.
- Fulvio Celsi, Paola Pizzo, Marisa Brini, Sara Leo, Carmen Fotino, Paolo Pinton, Rosario Rizzuto; Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration, 2009.
- Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events, 2009.
- Heiman-Patterson T.D, Deitcha J.S, Blankenhornb E.P, Erwina K.L, Perreault M.J, Alexandera B.K, Byersa N, Tomana I, Alexandera G.M. Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS, 2004.
- Honig LS, Chambliss DD, Bigio EH, Carroll SL, Elliott JL; Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls, 2000.
- Huisman MH, de Jong SW, van Doormaal PT, Weinreich SS, Schelhaas HJ, van der Kooij AJ, de Visser M, Veldink JH, van den Berg LH; Population based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology, 2011.
- Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms, 1979.
- Ichas F, Mazat J.P. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state, 1998.

- lino M. Ca²⁺-dependent inositol 1,4,5-trisphosphate and nitric oxide signaling in cerebellar neurons, 2006. Regulation of cell functions by Ca²⁺ oscillation, 2007.
- Jiang Q, Thrower E.C, Chester D.W, Ehrlich B.E & Sigworth F.J. Three-dimensional structure of the type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptor at 2.4 Å resolution, 2002.
- Johnston C.A, Stanton B.R, Turner B.R et al. Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London, 2006.
- Johnston J.A, Dalton M.J, Gurney M.E, and Kopito R.R; Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis, 2000.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis; Extensive TARDBP mutation screening reporting 8 different mutations in familial and sporadic ALS patients with clustering in TDP-43 C-terminal region, 2008.
- Kawamata H, Magrane J, Kunst C, King MP, Manfredi G. Lysyl-tRNA synthetase is a target for mutant SOD1 toxicity in mitochondria, 2008.
- Kawamata H. and Manfredi G; Different regulation of wild-type and mutant Cu,Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria, 2008.
- Kawamata H. and Manfredi G; Import, maturation and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space, 2010.
- Kawamata H. and Manfredi G; Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS, 2010.
- Khare S.D, Caplow M, Dokholyan N.V; The rate and equilibrium constants for a multistep reaction sequence for the aggregation of superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis, 2004.

- Kuzuhara S, Kokubo Y; Atypical parkinsonism of Japan: amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan (Muro disease): an update; 2005.
- Lautenschlaeger J, Prell T and Grosskreutz J. Endoplasmic reticulum stress and the ER mitochondria calcium cycle in amyotrophic lateral sclerosis, 2012.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD; Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis, 2000.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr, Meyer T. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx, 2005.
- Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brannstrom T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria, 2004.
- Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio' A, Couratier P, Mitchell JD, Swingler RJ, Beghi E; Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues, 2008.
- Luetjens C.M, Bui N.T, Sengpiel B, Münstermann G, Poppe M, Krohn A.J, Bauerbach E, Kriegelstein J, Prehn J. H. Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production, 2000.
- Lytton J. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers: three mammalian gene families control Ca^{2+} transport, 2007.
- Mackenzie I, Rademakers R. The role of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, 2008.
- Magrane J, Manfredi G. Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis, 2009.

- Mahmood T. and Yang P.C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, 2012.
- Marcelo R. Vargas and Jeffrey A. Johnson; Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes, 2010.
- Marchi S, Lupini L, Patergnani S, Rimessi A, Missiroli S, Bonora M, Bononi A, Corra F, Giorgi C, De Marchi E, Poletti F, Gafa R, Lanza G, Negrini M, Rizzuto R & Pinton P. Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25, 2013.
- Marshall I.C and Taylor C.W. Two calcium-binding sites mediate the interconversion of liver inositol 1,4,5-triphosphate receptors between three conformational states, 1994.
- Miller RG, Jackson CE, Kasarskis EJ, England JD, Forsheew D, Johnston W, Kalra S, Katz JS, Mitsumoto H, Rosenfeld J, Shoesmith C, Strong MJ, Woolley SC; Practice parameter update: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis: drug, nutritional, and respiratory therapies; Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, 2009.
- Miyawaki A., Lliops J., Heim R., McCaffery J.M., Adams J.A., Ikura M. and Tsien R. Y. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin, 1997.
- Nakai J, Tanabe T, Konno T, Adams B, Beam KG. Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling, 1998.
- Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx, 1997.
- Parker NJ, Begley CG, Smith PJ, Fox RM. Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5, 1996.
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown RH., Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria, 2004.

- Pasinelli P, Brown RH; Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics, 2006.
- Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Jr, Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis, 2000.
- Philips T. and Rothstein J.D. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2016.
- Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, Checchetto V, Moro S, Szabo I & Rizzuto R. The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit, 2011.
- Ravits JM, La Spada AR; ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration; Neurology, 2009.
- Renton EA, Chiò A. and Bryan J. Traynor. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics, 2014.
- Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE; Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS; Neurology, 2005.
- Rishi Rakhit, Avijit Chakrabartty; Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis, 2006.
- Rizzuto R, Carrington W, Tuft R.A. Digital imaging microscopy of living cells, 1998.
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay F.S, Fogarty K.E, Lifshitz L.M, Tuft R.A., Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses, 1998.
- Rizzuto R, Simpson A.W, Brini M, Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin, 1992.

Rosen D.R, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D.A, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan J.P, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, 1993.

Rostovtseva T. and Bezrukov S. VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids, 2008.

Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, et al. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis, 1990.

Rotunno, M. S., and Bosco, D. A; An emerging role for misfolded wildtype SOD1 in sporadic ALS pathogenesis, 2013.

Saccon R, Rosie K. A. Bunton-Stasyshyn, Elizabeth M.C. Fisher, and Pietro Fratta; Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? 2013.

Sara Zarei, Karen Carr, Luz Reiley, Kelvin Diaz, Orleiquis Guerra, Pablo Fernandez Altamirano, Wilfredo Pagani, Daud Lodin, Gloria Orozco and Angel China; A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis; Surgical Neurology International, 2015.

Saxena S, Cabuy E. and Caroni P. A role for motoneuron subtype selective ER stress in disease manifestations of FALS mice, 2009.

Shaw PJ, Eggett CJ; Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis, 2000.

Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers, 2012.

Stathopoulos PB, Zheng L, Ikura M. Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics, 2009.

Stathopoulos PB, Zheng L, Li GY, Plevin MJ, Ikura M. Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry, 2008.

- Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., and Culotta, V. C; A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage, 2001.
- Synofzik M, Ronchi D, Keskin I, Basak A.N, Wilhelm C, Gobbi C. et al. Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS, 2012.
- Tadic V, Prell T, Lautenschlaeger J and Grosskreutz J. The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis, 2014.
- Tafari F, Ronchi D, Magri F, Comi G and Corti S; SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis, 2015.
- Tainer J.A, Getzoff E.D, Beem K.M, Richardson J.S, Richardson D.C. Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase, 1982.
- Toyoshima C, Asahi M, Sugita Y, Khanna R, Tsuda T, MacLennan DH. Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca²⁺ ATPase, 2003.
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution, 2000.
- Toyoshima C. Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum, 2008.
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH Jr, Hediger MA. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter, 1999.
- Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, et al. Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity, 2007.
- Vargas M.R. and Johnson JA. The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes, 2009.

- Vedrana Tadic, Tino Prell, Janin Lautenschlaeger and Julian Grosskreutz; The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis, 2014.
- Vincent Picher-Martel, Paul Valdmanis, Peter V. Gould, Jean-Pierre Julien and Nicolas Dupré; From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS, 2016.
- Wang HY, Wang IF, Bose J, et al. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family, 2004.
- Wang J. Slunt, H. Gonzales, V. Fromholt, D. Coonfield, M. Copeland, N. G. et al; Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature, 2003.
- Wilcox K.C, Zhou L, Jordon JK, Huang Y, Yu Y, Redler RL, et al. Modifications of superoxide dismutase (SOD1) in human erythrocytes: a possible role in amyotrophic lateral sclerosis. J Biol Chem, 2009.
- Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, et al. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins, 2001.
- Williams T.L, Day N.C, Ince P.G, Kamboj R.K. and Shaw P.J. Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis, 1997.
- Zhang F, Strom AL, Fukada K, Lee S, Hayward LJ, Zhu H. Interaction between familial ALS-linked SOD1 mutants and the dynein complex: Implications of retrograde axonal transport in ALS, 2007.

Zundorf G. and Reiser G. Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection, 2011.

Cortassa S, Aon MA, Winslow RL, O'Rourke B. A mitochondrial oscillator dependent on reactive oxygen species, 2004.

Kawamata H, Ng SK, Diaz N, Burstein S, Morel L, Osgood A, Sider B, Higashimori H, Haydon PG, Manfredi G, Yang Y. Abnormal intracellular calcium signaling and SNARE-dependent exocytosis contributes to SOD1G93A astrocyte-mediated toxicity in amyotrophic lateral sclerosis, 2014.