

PROGETTO DI RICERCA SULLA SLA FINANZIATO DALLA FONDAZIONE VIALLI E MAURO

Rapporto Finale dell'attività svolta presso l'Istituto Mario Negri

Da settembre 2007 ad agosto 2010 la Dott.ssa Pozzi ha svolto attività di ricerca presso l'Istituto Mario Negri di Milano sotto la supervisione della Dott.ssa Bendotti e della Dott.ssa Bonetto grazie ad una borsa di studio erogata dalla Fondazione Vialli e Mauro per la Ricerca e lo Sport. In questi tre anni di lavoro la Dott.ssa Pozzi si è focalizzata sulla ricerca di biomarcatori traslazionali di Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).

La SLA è una malattia neurodegenerativa che colpisce selettivamente la popolazione motoneuronale e che porta il paziente a morte nel giro di 2-4 anni dalla diagnosi. Ad oggi la diagnosi di SLA viene effettuata solo grazie a valutazioni cliniche di specialisti del campo che diventano definitive dopo circa un anno dall'insorgenza dei primi sintomi. Inoltre, il numero di diagnosi falso-positive o falso-negative risulta ancora molto alto per questo tipo di patologia. Per il paziente, quindi, la diagnosi di SLA disponibile ad oggi porta all'impossibilità di sottoporsi a cure tempestive e specifiche. Per queste ragioni da diversi anni è emerso nella comunità scientifica internazionale legata alla SLA l'esigenza di identificare con precisione dei marcatori di patologia con lo scopo di poter aver a disposizione un test diagnostico rapido ed accurato. Un insieme di biomarcatori specifici di SLA può aiutare non solo gli specialisti nella diagnosi, prognosi e nel monitoraggio di interventi farmacologici ma anche i ricercatori nell'identificare con maggior precisione quelli che sono i meccanismi che distinguono questa malattia dalle altre neurodegenerazioni per poter sviluppare quindi dei trattamenti ancor più mirati ed efficienti. Da diversi anni all'Istituto Mario Negri di Milano, una proficua collaborazione tra la Dott.ssa Bendotti e la Dott.ssa Bonetto ha permesso di avviare e completare uno studio rivolto proprio all'identificazione di biomarcatori specifici di SLA. Pazienti e modelli animali sono stati infatti analizzati in modo comparativo con lo scopo di evidenziare alterazioni proteiche utili alla diagnosi della patologia ma soprattutto per capire le cause che la scatenano.

Il 90% dei casi di SLA è di tipo sporadico le cui cause sono ancora ignote. Il restante 10% invece presenta familiarità per mutazioni a carico di diversi geni. Tra questi il 5% dei casi è dovuto a mutazioni del gene per la superossido dismutasi 1 (SOD1) che negli anni ha permesso la generazione di modelli animali per l'identificazione e lo studio di meccanismi patogenetici della degenerazione dei motoneuroni. Nel corso di questi 3 anni la Dott.ssa Pozzi si è focalizzata sull'identificazione e la caratterizzazione di biomarcatori proteici confrontando le alterazioni osservate nei pazienti con quelle riscontrate nei modelli animali di SLA topi e ratti transgenici portatori del gene umano della

SOD1 con la mutazione G93A (sostituzione glicina-alanina in posizione 93), che rappresentano i modelli di malattia più caratterizzati e riproducibili. I modelli animali sono fondamentali nello studio di questa malattia in quanto permettono di esaminare i fenomeni associati alla patologia prima che questa si manifesti ed inoltre permettono di poter correlare alterazioni nei distretti del sistema nervoso centrale vulnerabili alla malattia con possibili modificazioni in tessuti periferici facilmente reperibili nell'uomo come il sangue. Lo studio è stato suddiviso in due fasi: la prima vedeva come obiettivo l'identificazione di alterazioni proteiche nel paziente mentre nel secondo era prevista l'analisi delle stesse alterazioni nel modello animale. Nel periodo di lavoro finanziato dalla fondazione la Dott.ssa Pozzi si è focalizzata in maggior modo sull'identificazione di biomarcatori traslazionali ovvero proteine che presentano lo stesso comportamento o modifica sia nel paziente che nel modello animale allo scopo di poterle utilizzare come indici dell'andamento della patologia e facilitare quindi lo studio di possibili terapie per la SLA.

Affinché la diagnosi sia rapida e di facile accesso per il paziente i biomarcatori devono essere cercati in un campione facilmente reperibile. Per queste ragioni si è deciso di analizzare campioni di sangue ed in particolare una sottopopolazione cellulare presente in questo campione ovvero linfociti e monociti, generalmente classificati come cellule polimorfonucleate (PBMC). La scelta del campione da analizzare si è basata non solo sulla facilità con cui questo può essere ottenuto dai pazienti ma anche perché a differenza di plasma o siero il compartimento cellulare risulta più stabile e la sua analisi comporta meno artefatti tecnici. Grazie alle metodiche di proteomica è stato possibile identificare con precisione sia proteine che variano la loro espressione nei pazienti a differenza dei controlli sani, che proteine alterate da eventi patologici quali ad esempio lo stress ossidativo.

Nel primo periodo di lavoro ci si è focalizzati sulle proteine che vengono alterate da un'eccessiva presenza di stress nitrativo mediato dall'ossido nitrico. È noto infatti che a causa di un'aberrante attività della SOD1 mutata o di altri stimoli tossici non identificati nella SLA sporadica, si sviluppa all'interno delle cellule motoneuronali un'elevata quantità di specie reattive dell'azoto (RNS). Queste forme vanno a danneggiare la cellula modificando le proteine che la compongono. Grazie all'analisi svolta nel nostro laboratorio è stato possibile identificare le proteine specificamente alterate da questo tipo di stress nelle cellule periferiche sia dei pazienti che dei topi affetti da SLA. Inoltre alcune di queste proteine sono state identificate anche nel midollo spinale dei topi così come nei reperti autoptici di midollo spinale di pazienti SLA. Le proteine alterate da stress nitrativo che sono state identificate nelle cellule periferiche di pazienti indicano alterazioni a livello sia strutturale della cellula (actina, alpha-actinina, vinculina, filamina-A) che funzionale (ATPasi, CD41). Nel modello animale SOD1G93A dipendente è stato possibile identificare le stesse proteine strutturali e funzionali (actina, vinculina, ATPasi). L'analisi svolta nei PBMC dei ratti ha inoltre evidenziato PDI, GRP78 e HSC70 come altre proteine funzionali nitrate. È inoltre risultato molto interessante il fatto che actina, ATPasi e HSC70 in forma nitrata siano state riscontrate anche nel midollo spinale del topo SOD1G93A. Il lavoro ha dunque messo in luce come uno specifico evento

caratterizzante la patologia possa essere evidenziato non solo nel tessuto patologico ma anche nelle cellule periferiche di un campione facilmente accessibile come il sangue. La presenza di determinate proteine affette da questo tipo di stress sia nei pazienti sporadici che nel modello animale ad uno stadio presintomatico può aiutare a chiarire meglio quali possono essere le cause e le conseguenze dello stesso. Inoltre, le evidenze di una sovrapposizione tra i meccanismi che avvengono nel sistema nervoso centrale e le cellule della periferia danno maggior rilievo alla emergente teoria per cui la SLA viene considerata come una malattia multi-cellulare e multi-sistemica. Questo lavoro è diventato pubblicazione scientifica nel 2009 edito da *Antioxidant & Redox Signaling* con il titolo "Nitroproteomics of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients and Rat Model of ALS" (Nardo G., Pozzi S., et al. vol.11, num.7, pp.1559-1567).

Un ulteriore sforzo nell'identificare i biomarcatori di SLA è stato effettuato nel secondo periodo di lavoro. Grazie alle metodiche di proteomica è stato possibile evidenziare proteine che presentano una diversa espressione nei PBMC di pazienti a diversi stadi della patologia rispetto a controlli sani e pazienti affetti da altre patologie neurodegenerative spesso confuse con la SLA (neuropatia dovuta a diabete, neuropatia assonale periferica, malattia di Charcot-Marie-Tooth, atassia spinocerebellare, sclerosi multipla, polimiosite, ecc...). L'analisi ha evidenziato ben 129 proteine che presentano un comportamento d'espressione diverso tra paziente e controllo sano. L'analisi con spettrometria di massa ha identificato 71 proteine che ricoprono diverse funzioni cellulari. Nelle cellule del sangue dei pazienti risulta infatti che proteine legate al metabolismo energetico, alla regolazione dello stress ossidativo e al mantenimento e degradazione di altre proteine, ma anche alla struttura cellulare, alla risposta infiammatoria e all'interazione con DNA/RNA siano alterate. Tra queste sono state scelte 14 proteine designate come candidati biomarcatori. La scelta è stata dettata dal fatto che alcune di queste proteine risultano, da dati presenti in letteratura, coinvolte nel sistema nervoso centrale, nei meccanismi caratteristici delle patologie neurodegenerative e alterate nella stessa SLA. I 14 candidati sono stati tutti validati su singolo paziente e con tecniche di facile utilizzo nell'ottica di avere in futuro un test diagnostico che possieda rapidità ed efficienza. L'indagine ha messo in luce che all'interno del pannello di biomarcatori selezionato è possibile discriminare con il 98% di accuratezza e sensibilità i pazienti dai controlli sani, con il 91% i pazienti SLA da pazienti di altre patologie neurodegenerative e con il 90% i due diversi stadi della patologia. La Dott.ssa Pozzi ha quindi verificato il comportamento di questi marcatori anche nel modello animale. Sono stati analizzati non solo i PBMC, per avere una corrispondenza con il paziente, ma anche il sistema nervoso centrale ed in particolare le corna dorsali e ventrali del midollo spinale lombare. E' noto infatti che nelle corna ventrali della porzione lombare siano presenti il maggior numero di motoneuroni che vanno incontro a degenerazione durante la patologia. L'analisi di questa zona, insieme alle cellule periferiche del sangue, quindi, permette di poter creare una correlazione tra la periferia e la popolazione cellulare del sistema nervoso centrale che va incontro agli eventi patologici. Dei 14 biomarcatori selezionati è stato possibile identificarne ben 5 che presentano uguale corrispondenza tra

paziente e modello animale addirittura allo stadio presintomatico. Si tratta di proteine legate allo stress nitrativo, al mantenimento dell'equilibrio durante lo stress ossidativo e di quello strutturale delle altre proteine, nonché all'interazione con DNA ed RNA. Questi marcatori quindi possiedono natura traslazionale poiché hanno uguale comportamento in pazienti e modello animale. Essi non solo possono indicare dei meccanismi da loro regolati responsabili della patologia ma permettono anche di evidenziare quelli che possono essere i bersagli da colpire con eventuali interventi terapeutici. Questo lavoro è al momento in fase di sottomissione e presenta il titolo "Mechanism-related multiprotein biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis in peripheral blood mononuclear cells" (Nardo G., Pozzi S., et al. 2010).

In conclusione, il lavoro svolto dalla Dott.ssa Pozzi nel periodo finanziato dalla Fondazione Vialli e Mauro ha contribuito quindi a identificare i biomarcatori traslazionali tra paziente e modello animale di SLA. Questi marcatori sono sia proteine alterate da eventi tipici della patologia, nello specifico lo stress ossidativo, ma anche proteine che presentano un'alterata espressione rispetto ai controlli sani. Il lavoro mette in luce diverse considerazioni di rilevanza scientifica. Per prima cosa vi è l'importanza di un nuovo compartimento cellulare, diverso dalla popolazione motoneuronale, che presenta analogie con questa ma soprattutto maggiore utilità nel campo della ricerca e della diagnosi clinica. In secondo luogo la presenza di corrispondenze tra casi sporadici di patologia, rappresentati dai pazienti analizzati, e casi familiari, in particolar modo i SOD1G93A dipendenti. Quindi, l'identificazione di bersagli chiave nell'uomo e nel modello animale, ad uno stadio presintomatico di quest'ultimo, che permettono una più approfondita analisi dei meccanismi che causano la patologia stessa. A questo proposito il laboratorio della Dott.ssa Bonetto si sta focalizzando sul coinvolgimento di un marcatore traslazionale che presenta un'alterata espressione nei casi di SLA e che potrebbe rivestire un'importanza chiave nell'eziopatogenesi ma anche diventare un potenziale target di un efficace trattamento farmacologico.