



UNIVERSITÀ DI PISA
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biologia Applicata alla Biomedicina
Curriculum Neurobiologico

Tesi di Laurea Magistrale

Analisi di polimorfismi nel promotore del gene NF-E2-related factor 2 (Nrf2) e di biomarcatori di stress ossidativo in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica.

Candidato

Relatore

Martina Modena

Prof. Gabriele Siciliano

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

Riassunto	1
1. Introduzione	5
1.1. La Sclerosi Laterale Amiotrofica	5
1.1.1 Aspetti generali	5
1.1.2 Epidemiologia	7
1.1.3 Eziopatogenesi	8
1.1.3.1 Fattori genetici	8
1.1.4.1 Eccitotossicità glutammatergica	14
1.1.4.2 Alterazioni mitocondriali	16
1.1.4.3 Stress ossidativo e relativi biomarcatori	18
1.2 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)	23
2. SCOPO	34
3. PAZIENTI e METODI	35
3.1 Popolazione di studio	35
3.2 Disegno dello studio	36
3.3 Metodiche di laboratorio	36
3.3.1 Genotipizzazione dei polimorfismi nel promotore del gene Nrf2	36
3.3.1.1 Estrazione di DNA genomico da sangue intero	36
3.3.1.2 Reazione a catena della polimerasi (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	37
3.3.1.3 Elettroforesi su gel d'agarosio	38
3.3.1.4 Purificazione del prodotto di PCR e analisi di sequenza	39
3.3.2 Biomarcatori di stress ossidativo	41
3.3.2.1 Determinazione dei prodotti di ossidazione avanza alle proteine (AOPP)	41
3.3.2.2 Determinazione della capacita ferro-riducente del plasma (FRAP)	42
3.3.2.3 Determinazione dei tioli plasmatici (-SH)	43
3.3.2.4 Determinazione dell'attività delle Superossido dismutasi (SOD)	44
3.3.2.5 Determinazione dell'attività della catalasi	45
4. Analisi statistica	47
5. Risultati	48
5.1. Analisi dei polimorfismi nel promotore del gene NRF2	48
5.2 Valutazione dei biomarcatori plasmatici di stress ossidativo	50
5.3 Relazione tra biomarcatori di stress ossidativo e gli SNPs nel promotore del gene NRF2	52
5. DISCUSSIONE	56
6. Conclusioni	66
7. Bibliografia	67
8. Ringraziamenti	87

RIASSUNTO

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da una progressiva e selettiva perdita dei motoneuroni a livello della corteccia motoria primaria, del tronco cerebrale e del midollo spinale. L'eziologia e la patogenesi della forma sporadica di SLA (SLAs) sono ancora in gran parte da chiarire. La SLAs viene considerata una malattia degenerativa multifattoriale, nella quale la morte cellulare sembra essere conseguenza della complessa interazione tra fattori di suscettibilità genetica e fattori ambientali. Per spiegare la morte neuronale sono state proposte diverse ipotesi, tra le quali le più accreditate chiamano in causa l'eccitotossicità glutammatergica, le alterazioni mitocondriali e lo stress ossidativo (Rothstein, 2009). Quest'ultimo sembra essere coinvolto nei meccanismi di neurodegenerazione che si manifestano nella SLAs, ma resta comunque da chiarire se lo stress ossidativo sia una causa della degenerazione neuronale o ne sia una conseguenza diretta.

Durante la respirazione aerobica, il metabolismo cellulare e la difesa contro agenti patogeni vengono prodotte specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS e RNS); a concentrazioni fisiologiche, ROS e RNS giocano un'importante funzione come mediatori e regolatori cellulari, ma ad elevati livelli portano inizialmente ad alterazioni nell'equilibrio redox cellulare e, in fine, allo sviluppo della condizione nota come stress ossidativo (Niedzielska et al., 2015). L'organismo umano, al fine di neutralizzare tali sostanze tossiche, ha sviluppato una pletera di meccanismi di difesa (Lee et al., 2005; Sykiotis e Bohmann, 2010). Tra questi, la via mediata dal fattore di trascrizione *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nfe2l2), noto anche come Nrf2, è attualmente riconosciuta come uno dei principali *pathway* di difesa cellulare contro lo stress indotto sia da sostanze pro-ossidanti che xenobiotiche (Dinková-Kostova e Amramov, 2015). Nrf2, tramite il legame ad una sequenza nucleotidica chiamata *Antioxidant Response Element* (ARE), modula l'attivazione trascrizionale dei suoi geni bersaglio (Dinková-Kostova e Amramov, 2015); tra questi sono presenti geni che codificano per enzimi antiossidanti e per enzimi di detossificazione di fase II (Kundu e Surh, 2008). Il coinvolgimento di Nrf2 nell'espressione, sia basale che inducibile, dei geni ARE-dipendenti lo rende il principale regolatore della risposta antiossidante e un modulatore di numerosi processi, quali la risposta immunitaria ed infiammatoria, il rimodellamento tissutale e la proliferazione cellulare (Hyberston et al., 2011). Sono stati identificati, nella regione del promotore di *NRF2*, tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), -653A>G -651G>A e -617C>A, in grado di modulare l'espressione e la funzione del gene stesso (Marzec et al., 2007). Diverse evidenze in letteratura hanno dimostrato l'implicazione di Nrf2 in molti meccanismi patogenetici coinvolti nella

neurodegenerazione (Johnson et al., 2010 (a); Pareek et al., 2011; Stack et al., 2010; Kim et al., 2013; Lou et al., 2014; Sarlette et al., 2008; Tanji et al., 2013; Bergstrom et al., 2014; Vargas et al., 2008). In particolare, è stata riportata un'associazione fra l'aplotipo GAGCAAAA, contenente i tre alleli comuni in corrispondenza dei siti polimorfici -653A>G, -651G>A e -651C>A, ed un ritardo di 4.6 anni nell'insorgenza della Malattia di Parkinson (PD), sia in una popolazione svedese che in una polacca (Von Otter M. et al., 2010); successivamente, gli stessi autori in uno studio di meta-analisi, esteso a pazienti italiani, maltesi e tedeschi, hanno individuato quattro singoli SNPs associati con l'età di insorgenza della malattia; specificamente, la variante allelica -653G anticipa l'esordio del PD di 1.1 anni per allele (Von Otter et al., 2014). Inoltre, Bergstrom e collaboratori hanno osservato l'associazione fra l'aplotipo GAGCAGA e un ritardo di 4 anni nell'età di insorgenza della SLA (Bergstrom et al., 2014).

In base a tali presupposti, lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare una possibile associazione tra i polimorfismi -653 A>G, -651 G>A e -617 C>A, presenti nel promotore del gene *NRF2*, e il rischio di insorgenza di SLA e la loro possibile implicazione nei meccanismi molecolari che sono alla base della risposta cellulare allo stress ossidativo. A tal fine abbiamo valutato:

- la distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche dei tre polimorfismi funzionali -653 A>G, -651 G>A e -617 C>A in 140 pazienti SLAs e 134 controlli sani; la genotipizzazione è stata condotta mediante sequenziamento automatico diretto della regione di DNA di interesse.
- i livelli plasmatici di alcuni biomarcatori di stress ossidativo, determinati tramite metodi spettrofotometrici; in particolare, come marker di danno ossidativo, sono stati dosati i Prodotti di Ossidazione Avanzata alle Proteine (AOPP) e, come markers antiossidanti non enzimatici, la Capacità Antiossidante Ferro Riducente (FRAP) e i gruppi tiolici totali plasmatici. Inoltre, come markers antiossidanti enzimatici, sono stati valutati, in 28 pazienti SLAs e in 10 controlli sani, l'attività totale dell'enzima Superossido Dismutasi (SOD) e della Catalasi (CAT).
- la possibile influenza delle varianti alleliche rare -653G, -651A e -617A sui livelli plasmatici dei marcatori di stress ossidativo, sia nella popolazione totale che nelle popolazioni di pazienti e controlli separatamente, suddividendo i soggetti in base al genotipo per ogni polimorfismo oggetto di studio.
- l'eventuale associazione dei polimorfismi funzionali presenti nel promotore con le caratteristiche cliniche dei pazienti, in particolare forma clinica (bulbare o spinale), durata media di malattia, età di esordio e punteggio dell'*ALS Functional Rating Scale* (ALSFRS).

L'analisi dei dati relativi allo SNP -653A>G mostra la variante allelica -653G associata ad aumento del rischio di malattia (OR 1.71 IC95% 1.18-2.48); relativamente ai polimorfismi -651 G>A e -617 C>A non abbiamo riscontrato differenze significative nella distribuzione genotipica e nelle frequenze alleliche dei pazienti con SLAs rispetto ai relativi controlli.

In relazione all'eventuale associazione dei polimorfismi studiati con le caratteristiche cliniche dei pazienti i risultati ottenuti mostrano che lo SNP -653A>G non influenza né la forma clinica (bulbare o spinale) né il punteggio dell'ALSFRS; nonostante non siano state evidenziate differenze significative della durata di malattia tra i gruppi genotipici, si nota comunque una riduzione di tale parametro (rispettivamente di 11 e 18 mesi) nei portatori dei genotipi -653AG e -653GG rispetto ai pazienti con genotipo -653AA.

Dall'analisi dei dati relativi allo stress ossidativo emerge che i livelli plasmatici degli AOPP risultano essere più elevati nei pazienti SLAs rispetto ai controlli ($p<0.001$), mentre i livelli dei tioli sono ridotti nei primi rispetto ai secondi ($p<0.001$). In relazione agli enzimi antiossidanti è stata osservata un'elevata attività della SOD nei pazienti rispetto ai controlli ($p<0.001$). Per quanto riguarda la FRAP e la catalasi non sono state riscontrate differenze tra i due gruppi di studio.

Suddividendo i soggetti della nostra popolazione di studio nei portatori dei tre genotipi generati dal polimorfismo -653A>G i nostri risultati mostrano un aumento significativo dei livelli plasmatici degli AOPP e della FRAP nei portatori del genotipo -653AG rispetto ai soggetti -653AA sia nella popolazione totale che nel gruppo dei pazienti, mentre non si riscontrano differenze in quello dei controlli. Al contrario, i livelli plasmatici dei gruppi tiolici totali risultano ridotti nei soggetti -653AG rispetto a quelli -653AA, nella popolazione totale; un *trend* di riduzione con andamento simile è stato riscontrato solo nei pazienti, seppure non venga raggiunta la significatività. Non sono emerse differenze significative tra i livelli dei biomarcatori misurati nei portatori dei genotipi derivanti dagli SNPs -651G>A e -617C>A.

Inoltre, i risultati mostrano, seppur in una ridotta sottopopolazione (28 pazienti e 10 controlli), un aumento significativo dell'attività della SOD nei soggetti -617CA rispetto ai -617CC e nei soggetti -651GG rispetto ai -651GA, lo stesso *trend* si osserva per l'attività della catalasi. Non si osservano variazioni nell'attività dei due enzimi in relazione ai genotipi generati dal polimorfismo -653A>G.

In conclusione, i dati ottenuti nel presente lavoro di tesi indicano che la variante allelica -653G è associata ad un aumento del rischio di malattia. Inoltre, si osserva la presenza di un alterato equilibrio redox nei pazienti SLAs così come un legame tra il genotipo -653AG e la condizione di stress ossidativo. In base ai risultati ottenuti possiamo ipotizzare che la presenza dell'allele -653G conduca ad un deficit di espressione della proteina Nrf2 con alterazione del *pathway*

Nrf2-ARE e conseguente attenuazione della risposta antiossidante cellulare. Ciò può indurre un accumulo di ROS che risulta deleterio soprattutto a livello neuronale, data l'elevata sensibilità del sistema nervoso centrale (SNC). Diversi studi in letteratura hanno dimostrato come la sovraespressione indotta di *NRF2* conferisca neuroprotezione attraverso un incremento della produzione di enzimi antiossidanti indispensabili per la difesa contro lo stress ossidativo cerebrale (Vargas et al., 2008; Stack et al., 2010; Lou et al., 2014; Yang et al., 2015). Possiamo quindi ipotizzare che molecole induttrici di Nrf2 potrebbero essere utilizzate come trattamento per migliorare le difese cellulari in risposta a stress ossidativo ed infiammatorio anche nei pazienti affetti da SLA.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

1.1.1 ASPETTI GENERALI

Le malattie del motoneurone (MNDs) sono un gruppo eterogeneo di patologie neurodegenerative caratterizzate da una progressiva e selettiva perdita dei motoneuroni a livello della corteccia motoria primaria, dei tratti cortico-spinali, del tronco cerebrale e del midollo spinale. Tra le MNDs, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è quella più frequente, tanto da rappresentarne l'85% dei casi (Uccelli et al., 2007; Zhang et al., 2015).

La SLA, definita negli Stati Uniti malattia di Lou Gehrig dal nome del giocatore di baseball affetto, in Francia come malattia di Charcot dal nome del neurologo francese che per primo definì l'entità clinica di SLA, nei paesi anglosassoni come malattia dei motoneuroni, venne descritta per la prima volta da Charles Bell nel 1830, che riportò un caso caratterizzato da paralisi progressiva degli arti e della lingua associato a degenerazione della parte anteriore del midollo spinale (Charcot, 1883; Valetdinova et al., 2015). Jean-Martin Charcot fu, invece, il primo a considerare la progressiva debolezza muscolare non come una miopatia, ma come conseguenza di una condizione patologica dei neuroni motori spinali e nel 1879 conìò il termine SLA, cosicché riflettesse le caratteristiche distintive della malattia: "sclerosi laterale" in riferimento alla consistenza dura (sclerosi), riscontrata nell'elemento autoptico, dovuta alla gliosi secondaria alla degenerazione dei tratti corticospinali nelle colonne laterali del midollo spinale; "amiotrofica" per identificare la perdita di massa muscolare (atrofia) conseguente alla degenerazione dei neuroni periferici (Charcot, 1883; Turner et al., 2010; Valetdinova et al., 2015).

La SLA è una patologia progressiva con decorso fatale, in cui sono selettivamente colpiti i motoneuroni piramidali della corteccia motoria (neuroni motori superiori o centrali) e i neuroni motori nei nuclei dei nervi cranici del tronco cerebrale e quelli delle corna anteriori del midollo spinale (neuroni inferiori o periferici). I motoneuroni centrali consentono, attraverso la via piramidale, di trasmettere gli impulsi motori, elaborati a livello corticale, ai motoneuroni nelle corna anteriori del midollo spinale; poi, gli assoni dei motoneuroni periferici formano le giunzioni neuromuscolari con i muscoli scheletrici e permettono quindi la genesi dei movimenti volontari (Figura 1). La progressiva neurodegenerazione di questa via porta a denervazione ed i muscoli, non ricevendo più gli impulsi dai nervi lesionati, si indeboliscono fino ad atrofizzarsi (Cluskey e Ramsden, 2001; Calvo et al., 2014).

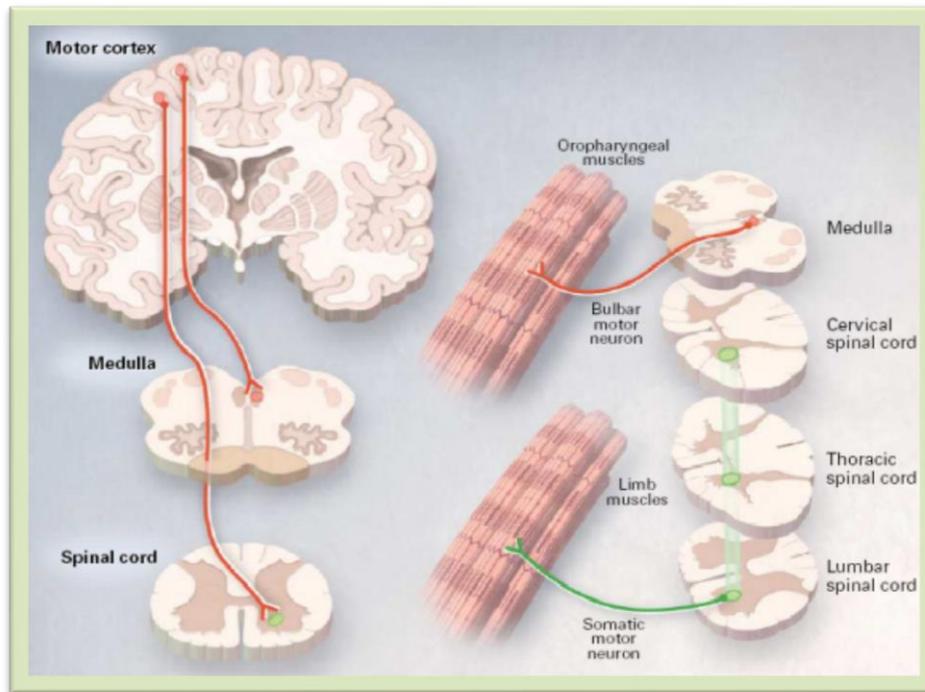


Fig.1: Motoneuroni selettivamente colpiti nella SLA. Il segnale nervoso generato dai neuroni motori centrali nella corteccia motoria giunge, tramite la via piramidale, ai motoneuroni periferici, presenti nei nuclei dei nervi cranici del tronco cerebrale e nelle corna anteriori del midollo spinale, che inviano il segnale ai muscoli scheletrici. (Rowland and Shneider, 2001).

In un primo momento la degenerazione interessa una specifica popolazione di motoneuroni, poi, per il carattere progressivo della malattia, la degenerazione diventa sistemica. Per tal motivo la sintomatologia, eterogenea fra i pazienti, si manifesta inizialmente con debolezza muscolare ed atrofia alle estremità distali degli arti, in special modo di quelli superiori, coinvolgendo poi un fascio muscolare o un arto, con riduzione della forza e perdita di funzionalità dell'arto interessato; la degenerazione conduce rapidamente a denervazione che provoca paralisi degli arti, disfagia e disartria (Cluskey e Ramsden, 2001). Rimangono illesi i nuclei oculomotori nel tronco encefalico ed il nucleo di Onuf nel midollo spinale, deputati al controllo volontario degli sfinteri vescicali e delle funzioni intestinali; la patologia, inoltre, non altera la vista, l'olfatto, il gusto, l'udito e il tatto (Iwata e Hirano, 1978; Wijesekera e Leigh, 2009). Nel corso dell'ultimo secolo i disturbi cognitivi e comportamentali, osservati nella malattia, sono sempre più riconosciuti; lo spettro delle anomalie cognitive, che colpiscono il 35,6-50 % dei pazienti affetti da SLA, è molto ampio e può variare da un deficit del linguaggio ad una vera e propria forma dementigena (Irwin et al., 2007; Calvo et al., 2014; Khin Khin et al., 2015). Fascicolazioni e crampi muscolari restano comunque i principali segni clinici e anticipano di qualche mese, o addirittura di alcuni anni, i sintomi clinici veri e propri: debolezza muscolare, alterazione dei riflessi tendinei e segno positivo di Babinski (D'Amico et al., 2013).

Dal punto di vista istopatologico la malattia è caratterizzata dalla presenza di inclusioni intracitoplasmatiche. Non è ancora chiaro se la formazione di aggregati neuronali provochi direttamente tossicità cellulare contribuendo alla neurodegenerazione o se costituisca un sottoprodotto della neurodegenerazione stessa; è stato inoltre ipotizzato che tali aggregati siano il risultato di un meccanismo di difesa mirato a ridurre le concentrazioni intracellulari di proteine tossiche (Shaw et al., 2005; Cozzolino et al., 2008). Tra le inclusioni intracellulari riscontrate nei pazienti SLA troviamo:

- Corpi di Bunina (BB), piccole inclusioni eosinofile presenti nel 70-100% dei casi; sono state osservate all'interno del corpo cellulare e dei dendriti dei neuroni interessati dalla malattia, anche se occasionalmente possono ritrovarsi in cellule neuronali sane (Bunina, 1962; Piao et al., 2003). Due delle proteine identificate facenti parte dei corpi di Bunina sono la cistatina C e la transferrina (Mizuno et al., 2006; Koichi et al., 2008).
- Inclusioni ubiquitinate (UBIS), possono essere suddivise in *Skein-like inclusion* (SLI), filamentose e in *Lewy-body like*, rotondeggianti. Sono presenti nel 95% dei casi e sembra che il loro principale costituente sia la *DNA TAR binding protein 43* (TDP-43) (Leigh et al., 1991; Sasaki et al. 1992; Neumann et al., 2006).
- *Hyaline conglomerate (Neurofilament) inclusions* (HCIs), inclusioni argirofile trovate nei motoneuroni del midollo spinale (Xiao et al., 2006).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

La SLA è una malattia rara; il suo tasso di incidenza è di 1.2-4.0 soggetti colpiti su 100000 individui ogni anno nella popolazione caucasica (Logroscino et al., 2010; Marin et al., 2014) e può variare in alcuni gruppi etnici: è, ad esempio, inferiore tra gli Indiani d'America (Gordon et al., 2013) e più alto di 50-100 volte nelle popolazioni dell'isola di Guam, della Nuova Guinea e della penisola di Kii, in Giappone. È stato ipotizzato che tali variazioni siano legate a fattori ambientali (Gordon, 2013). Un elevato numero di casi di SLA sono stati anche descritti in reduci della guerra del Golfo (Kasarskis et al., 2009) e in atleti (Chiò et al., 2005). La frequenza è più elevata nel sesso maschile rispetto a quello femminile, con un rapporto di 1.5:1 (Manjaly et al., 2010). Generalmente il picco di esordio della malattia si ha intorno ai 50-60 anni (Chiò et al., 2013), ma sono state descritte forme giovanili nell'1% dei casi (prima dei 25 anni) e nel 10% si assiste ad una precoce età di insorgenza (prima di 45 anni) (Logroscino et al., 2010; Turner e Kiernan, 2012). La forma più comune di SLA è quella sporadica (SLAs), che annovera il 90% dei casi, mentre una chiara familiarità è stata riscontrata solo nel 5-10% dei casi (SLAf) (Al-Chalabi et al., 2014; Zhang, 2015).

1.1.3 EZIOPATOGENESI

L'eziologia e la patogenesi della SLA sono ancora in gran parte da chiarire. La SLA viene considerata una malattia degenerativa multifattoriale, nella quale la morte cellulare è conseguente alla complessa interazione tra fattori genetici e fattori ambientali. Negli ultimi anni, grazie alle nuove tecnologie di biologia molecolare è stato possibile identificare mutazioni genetiche responsabili dell'insorgenza della SLA. Nonostante siano stati condotti molteplici studi, sia su modelli murini, che nell'uomo, l'esatto processo molecolare di neurodegenerazione dei motoneuroni nella SLA rimane ancora sconosciuto (Cozzolino et al., 2015). Per spiegare la morte neuronale sono state proposte diverse ipotesi, tra le quali le più accreditate chiamano in causa, l'eccitotossicità glutammatergica, le alterazioni mitocondriali e lo stress ossidativo; altri processi che potrebbero essere coinvolti nella neurodegenerazione sono la carenza di fattori neurotrofici, i processi infiammatori e i difetti nel trasporto assonale (Rothstein, 2009).

1.1.3.1 Fattori genetici

Dall'analisi degli alberi genealogici dei casi di SLA sono emersi modelli di trasmissione mendeliani, ed è stato evidenziato che in questi casi la patologia si manifesta anticipatamente (48 anni di media) e, generalmente, presenta un'evoluzione più rapida. La SLA viene ereditata principalmente come carattere autosomico dominante, il più delle volte ad alta penetranza o con penetranza ed espressività variabili, ma sono state riportate modalità di trasmissione autosomica recessiva ed anche legata al cromosoma X (Deng et al., 2011; Leblond et al., 2014).

La base genetica della SLA è rimasta poco compresa fino al 1989 quando, attraverso l'analisi di *linkage*, è stato identificato il primo locus (SLA1) sul cromosoma 21, associato a SLA con trasmissione autosomica dominante ed insorgenza nell'età adulta (Siddique et al., 1989; Siddique et al., 1991). Successivamente, grazie alla tecnica del *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), è stato identificato il gene mutato in questo locus, il gene Superossido Dismutasi 1 (*SOD1*); il suo sequenziamento diretto ha consentito l'identificazione di diverse mutazioni missenso (Rosen et al., 1993). Dalla sua scoperta sono state riportate più di 170 alterazioni nucleotidiche (Abel et al., 2012). Successivamente sono stati identificati altri geni causativi: *Fused in Sarcoma/Translocated in liposarcoma* (*FUS/TLS*), *DNA TAR-binding protein* (*TARDBP*), *Chromosome 9 open reading frame 72* (*C9orf72*), *Senataxin* (*SETX*), *Vesicle associated membrane protein-associated protein B* (*VAPB*), *Angiogenin* (*ANG*), *Optineurin* (*OPTN*), *Valosin Containing Protein* (*VCP*), *Ubiquilin 2* (*UBQLN2*), *Alsin* (*ALS2*) e *Spastic Paraplegia 11* (*SPG11*) (Abel et al. 2012; Chen et al., 2013; Leblond et al., 2014, Ingre et al., 2015); mutazioni in questi ultimi due geni sono responsabili della maggior parte dei casi ad esordio giovanile di SLA (Hadano et al., 2001; Orlacchio et al. 2010). Ad oggi, le ricerche in

campo genetico hanno permesso di identificare 17 geni causativi le cui mutazioni rendono conto del 70% dei casi di SLAf (tabella 1), ed una lunga serie di geni di suscettibilità (tabella 2).

Locus	Chromosome	Gene ID	Protein/function
ALS1	21q22.11	<i>SOD1</i>	Cu/Zn superoxide dismutase 1, soluble/ Oxidative stress
ALS2	2q33.2	<i>ALS2</i>	Alsin/Rho guanine nucleotide exchange factors
ALS4	9q34.13	<i>SETX</i>	Senataxin/RNA/DNA helicase
ALS5	15q21.1	<i>SPG11</i>	Spatacsin/transmembrane protein
ALS6	16p11.2	<i>FUS</i>	Fused in sarcoma/RNA-binding protein, DNA repair, exon splicing
ALS7	20p13	Unknown	Unknown
ALS8	20q13.33	<i>VAPB</i>	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/vesicular trafficking
ALS10	1p36.22	<i>TARDBP</i>	TAR DNA binding protein 43/transcriptional repressor, splicing regulation
ALS12	10p13	<i>OPTN</i>	Optineurin/ocular tension, membrane and vesicle trafficking
ALS14	9p13.3	<i>VCP</i>	Valosin-containing protein/ATP-binding protein, vesicle transport and fusion
ALS15	Xp11.21	<i>UBQLN2</i>	Ubiquilin 2/ubiquitination, degradation
ALS16	9p13.3	<i>SIGMAR1</i>	Sigma non-opioid intracellular receptor 1/endoplasmic reticulum chaperone
	12q24.11	<i>DAO</i>	D-amino-acid oxidase/unknown
	17p13.2	<i>PFN1</i>	Profilin 1/actin binding protein, actin polymerization
	7p15.2/12q13.3	<i>hnRNPA2B1/A1</i>	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein/mRNA processing, metabolism & transport
ALS-FTD1	9q21-q22	Unknown	Unknown
ALS-FTD2	9p21.2	<i>C9ORF72</i>	Chromosome 9 open reading frame 72/unknown

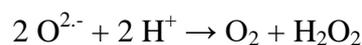
Tabella 1: Geni causativi della malattia (Leblond et al, 2014).

Locus	Chromosome	Gene ID	Gene name/function
ALS9	14q11.1	<i>ANG</i>	Angiogenin/ribonuclease
ALS11	6q21	<i>FIG. 4</i>	SAC1 lipid phosphatase domain containing (<i>S. cerevisiae</i>)/polyphosphoinositide phosphatase
ALS13	12q24.12	<i>ATXN2</i>	Ataxin 2/unknown
	2p13.1	<i>DCTN1</i>	Dynactin/axonal transport
	3p11.2	<i>CHMP2B</i>	Chromatin modifying protein 2B/
	7q36.2	<i>DPP6</i>	Dipeptidyl-peptidase 6/
	6p21.1	<i>VEGF</i>	Vascular endothelial growth factor/angiogenic, vascular, growth, migration & apoptosis factor
	19p13.12	<i>UNC13A</i>	Unc-13 homolog A/
	22q12.1-q13.1	<i>NEFH</i>	Neurofilament, heavy polypeptide/intracellular transport to axons and dendrites
	12q13.12	<i>PRPH</i>	Peripherin/cytoskeletal protein
	5q35.3	<i>SQSTM1</i>	Sequestosome 1/scaffold protein, NFkB signaling pathway
	17q12	<i>TAF15</i>	TATA box binding protein (TBP)-associated factor/RNA polymerase II gene transcription
	8p21.1	<i>ELP3</i>	Elongator acetyltransferase complex subunit 3/transcript elongation
	5q13.2	<i>SMN1</i>	Survival of motor neuron 1
	7q21.3	<i>PON1,2,3</i>	Paraoxonase/organophosphate hydrolysis
	6p22.1	<i>HFE</i>	Hemochromatosis/iron absorption
	1q24.2	<i>KIFAP3</i>	Kinesin-associated protein 3/small G protein
	14q11.2	<i>APEX1</i>	APEX nuclease 1/apurinic/aprimidinic endonuclease
	17q21.31	<i>PGRN</i>	Progranulin/cell growth regulator
	12p12.1-11.23	<i>ITPR2</i>	INOSITOL 1,4,5-trisphosphate receptor type 2
	3p22.2	<i>PLCD1</i>	Phospholipase C delta 1
	5q13.2	<i>ARHGEF28</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor 28

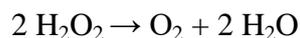
Tabella 2: Geni di suscettibilità della malattia (Leblond et al, 2014).

Una singola mutazione può portare a diverse forme cliniche e fenotipi simili possono derivare da differenti mutazioni; questo suggerisce che la malattia sia la risultante di diverse cause che hanno in comune alcuni meccanismi fisiopatologici (Ravits et al., 2013).

La SLA1 rappresenta la forma meglio studiata e nel complesso la più conosciuta; è dovuta a mutazioni nel gene *SOD1* che sono state riscontrate in tutti e 5 gli esoni rappresentanti i domini funzionali del gene e sono prevalentemente mutazioni missenso, anche se è stata segnalata una piccola percentuale di mutazioni nonsense, inserzioni e delezioni; tali mutazioni si trovano in circa il 20% dei pazienti con SLA_f e nel 1-4% di SLA_s (Pasinelli et al., 2006; Chen et al., 2013). Tra le mutazioni più frequentemente riscontrate nei pazienti troviamo la Leu144Phe, la Asp90Ala e la Glu21Gly (“*ALS online genetics database*”, ALSod, <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/> (Abel et al., 2012)). Non è possibile definire un fenotipo caratteristico per i casi di SLA con mutazione *SOD1*, dal momento che questi si presentano con una ampia variabilità nell’età d’esordio, nella gravità e nella durata della malattia (Turner et al., 2013). Il gene *SOD1*, localizzato sul cromosoma 21q22.1, codifica per una proteina citoplasmatica, la superossido dismutasi Cu/Zn, un omodimero di 153 aminoacidi, che contiene un atomo di rame ed uno di zinco, importanti rispettivamente per l’attività catalitica e la stabilità strutturale della proteina. *SOD1* appartiene alla classe delle ossidoreduttasi e la sua funzione è quella di detossificare i radicali superossido ($O_2^{\cdot-}$), prodotti dalla fosforilazione ossidativa, e convertirli in perossido di idrogeno ed ossigeno, trasformati poi in acqua ed ossigeno da altri enzimi della famiglia delle ossidoreduttasi come la catalasi (CAT) e la glutazione perossidasi (GPX) (Higgins et al., 2002).



Reazione catalizzata da SOD1



Reazione catalizzata dalla Catalasi

L’esatto meccanismo mediante il quale le mutazioni di *SOD1* conducono alla malattia non è noto; una prima spiegazione mise in relazione le mutazioni presenti con una ridotta attività enzimatica (Deng et al., 1993). Successivi studi, condotti su pazienti con SLA_f e su topi transgenici che esprimono *SOD1* mutata sembrano suggerire, però, che la perdita dell’attività non sia sufficiente a provocare la malattia e che le mutazioni contribuiscano alla neurodegenerazione nella SLA con un meccanismo, ancora sconosciuto, di tipo *gain of function* (Robberecht, 2000; Massimalany et al., 2013). Studi condotti su topi *knockout* per *SOD1* dimostrano che i modelli non sviluppano la malattia, sebbene possano ammalarsi di una forma di motoneuropatia distale (Reaume et al., 1996); inoltre, la tossicità di *SOD1* nei mutanti non può essere revertita da coespressione della proteina *SOD1 wild-type* (Bruijn et al., 1998). Sono stati

generati diversi topi transgenici con mutazioni in *SOD1*, specificamente i topi SOD1 G93A sono il modello più utilizzato per gli studi sulla SLA, sia per definire i meccanismi molecolari alla base della malattia che per valutare nuove risposte farmacologiche (Gurney, 1994). Nei topi portatori della mutazione G93A si riscontra un aumento della funzione enzimatica, con maggiore formazione di radicali liberi rispetto a modelli murini che esprimono la proteina *wild-type* (Gurney, 1997). È stato ipotizzato, quindi, che mutazioni a carico del gene *SOD1* possano indurre tossicità cellulare tramite aggregazione proteica, stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, eccitotossicità glutammatergica, infiammazione, attivazione della microglia ed alterazione nel trasporto assonale. I meccanismi patogenetici considerati sono comuni non solo alle forme di SLA dipendenti da mutazioni presenti nel gene *SOD1*, ma anche alle altre forme, comprese quelle sporadiche, tanto che i diversi casi sono difficilmente distinguibili clinicamente. A tal proposito è stato supposto che tutti i casi di SLA condividano uno o più meccanismi patologici. (Redler e Dokholyan, 2012; Turner et al., 2013; Chen et al., 2013).

Le mutazioni nel gene *FUS/TLS* sono state identificate in una grande famiglia di Capo Verde che presentava numerosi casi di SLAf, trasmessa con modalità autosomica recessiva e su diverse famiglie inglesi con SLAf, trasmessa con modalità autosomica dominante. Fino ad oggi sono state scoperte circa 50 mutazioni nel gene *FUS*, la maggior parte delle quali localizzate nella porzione C-terminale, che spiegano circa il 4% dei casi di SLAf (SLA6) e l'1% di SLAs (Lanson et al., 2012; Andersen et al., 2011). Il gene *FUS*, localizzato sul cromosoma 16p11.2, codifica per una *DNA/RNA binding protein* di 526 aminoacidi che è deputata al trasporto dell'mRNA dal nucleo al citoplasma. Nella maggior parte delle cellule, la proteina FUS è presente sia nel nucleo che nel citoplasma; nei neuroni è più presente, in proporzione, nel nucleo che nel citoplasma, mentre nella glia è esclusivamente nucleare (Vance et al., 2009). Le mutazioni nella proteina perturbano il normale passaggio di FUS tra il compartimento citoplasmatico e quello nucleare causandone una localizzazione citoplasmatica con conseguente accumulo in aggregati (Bosco et al., 2010; Dormann et al., 2010). Nel topo transgenico l'overespressione di *FUS* mutante determina una progressiva paralisi dovuta alla degenerazione motoria assonale ed alla perdita cellulare nella corteccia e nell'ippocampo (Haung et al., 2011). L'analisi neuropatologica *post mortem* su tessuti di encefalo e midollo spinale di pazienti SLA, che presentavano mutazioni a carico del gene, ha mostrato la ritenzione citoplasmatica e la formazione di aggregati neuronali di FUS ubiquitina-positivi (Neumann et al., 2009). Il gene *FUS* è responsabile della forma SLA6 caratterizzata da un ampio *range* di età di esordio di malattia, dai 26 agli 80 anni, con una media di sopravvivenza intorno ai 33 mesi (Millecamps et al., 2010).

Le mutazioni nel gene *TARDBP* sono state descritte per la prima volta in casi di SLAf nel 2008 (SLA10) (Sreedharan et al., 2008). Da allora sono state identificate più di 30 mutazioni in diversi

gruppi etnici, con una incidenza pari al 4-5% nei casi familiari e al 1-2 % nei casi sporadici (Rutherford et al., 2008; Mackenzie et al., 2010). I pazienti con queste mutazioni hanno ampia variabilità nella durata di malattia e nell'età d'esordio (dai 30 ai 77 anni) e presentano un fenotipo più frequentemente spinale (Corcia et al., 2012; Chen et al., 2013). Il gene codifica per la proteina TDP-43, una *DNA/RNA binding protein* di 414 aminoacidi, coinvolta in diverse funzioni, tra cui la trascrizione genica e lo splicing dell'RNA (Buratti et al., 2010). La maggior parte delle mutazioni identificate riguardano la regione C-terminale, coinvolta nelle interazioni proteina-proteina, ma ancora non è noto con quale meccanismo tali mutazioni causino neurodegenerazione: sono state chiamate in causa, ad esempio, sia la perdita della funzione nucleare sia un aumento della tossicità, dato che la proteina TDP-43 ubiquitinata è uno dei maggiori componenti delle inclusioni citoplasmatiche nella SLA (Sreedharan et al., 2008). Queste inclusioni sono state osservate anche in altre patologie neurodegenerative, come la demenza frontotemporale (FTD), la Corea di Huntington (HD), la Malattia di Alzheimer (AD) e la Malattia di Parkinson (PD) (Da Cruz et al., 2011).

Sia FUS che TDP-43 presentano nella regione C-terminale un dominio ricco di glutammina, asparagina e glicina, fondamentale per la polimerizzazione e sembra che le mutazioni presenti in questo sito portino ad aggregazione citoplasmatica con legame della proteina mutata all'ubiquitina e conseguente degradazione proteasomica; per entrambe le proteine mutata è stata riportata la formazione di granuli da stress, cioè aggregati intracellulari contenenti mRNA non tradotto, fattori di inizio della traduzione, piccole subunità ribosomiali ed *RNA-binding proteins*, formati in risposta ad insulti come lo stress ossidativo o lo shock termico. Probabilmente le mutazioni delle proteine FUS e TDP-43 nei pazienti con SLA aumentano la vulnerabilità dei motoneuroni a determinati stress cellulari e questo potrebbe rappresentare l'input della neurodegenerazione in queste forme di SLA (Bosco et al., 2010; Chen et al., 2013).

Contrariamente agli altri geni associati alla SLA, per i quali sono state individuate variazioni di singoli nucleotidi, la mutazione identificata nel gene *C9ORF72* consiste in un'espansione esanucleotidica GGGGCC (G 4 C 2), riconosciuta come la mutazione più frequente; infatti, è stata identificata nel 30-40% dei casi di SLA e nel 7-10% di SLAs (SLA-DFT2) (Renton et al., 2011; DeJesus-Hernandez et al., 2011; Gijssels et al., 2012). Il gene è stato identificato nel 2011 da due gruppi indipendenti, guidati da DeJesus-Hernandez e Renton, sul cromosoma 9p21 ed è costituito da 12 esoni di cui i primi due non codificanti (1a e 1b); è proprio nella regione intronica posta fra questi due esoni che si localizza l'espansione esanucleotidica. Nei pazienti affetti da SLA si riscontra un numero di ripetizioni superiore a mille, mentre nella popolazione sana sono presenti 2-30 ripetizioni (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). La funzione della proteina *C9ORF72* non è ancora del tutto chiara; alcuni studi ipotizzano che

l'espansione GGGGCC possa portare a ridotta disponibilità della proteina funzionante (Belzil et al., 2013), altri lavori suggeriscono che la tossicità della mutazione potrebbe essere dovuta ad un guadagno di funzione della proteina con accumulo del suo RNA nel nucleo che andrebbe ad interferire con la funzionalità cellulare; recentemente è stato evidenziato come la mutazione possa portare alla formazione di grovigli ibridi DNA-RNA, che oltre ad interferire con le normali attività cellulari, sono in grado di legare e bloccare 288 proteine nucleari, tra cui la nucleolina, preposta alla produzione dei ribosomi (Haeusler et al., 2014). Farg e collaboratori (2014) hanno inoltre dimostrato che l'espansione GGGGCC può interferire con il traffico vescicolare e con il meccanismo autofagico.

Oltre ai geni già citati, coinvolti nella maggior parte dei casi di SLAf, ne sono stati identificati anche altri. Nel 1994 è stato mappato, sul cromosoma 2q33-35, il gene *ALS2*, codificante la proteina Alsina che, se mutata, è responsabile di una forma giovanile rara (SLA2), caratterizzata da spasticità progressiva ascendente, dagli arti inferiori al volto, con disfunzione vescicale. L'Alsina, in condizioni fisiologiche, sembra avere una funzione neuroprotettiva nei confronti dei neuroni mentre le mutazioni compromettono tale funzione causando un'aggregazione di vescicole immature e proteine all'interno dei neuroni stessi (Kanekura et al., 2004). Sul cromosoma 9q34 è stato mappato il gene *SETX*, responsabile di una forma giovanile autosomica dominante (SLA4), in cui la funzione respiratoria e dei muscoli bulbari è conservata e che presenta una lenta progressione tanto da consentire una normale aspettativa di vita. Il gene *SETX* codifica per una DNA-RNA elicasi coinvolta nel processamento dell'RNA; questo meccanismo potrebbe essere implicato nella patogenesi di questa forma di malattia dei motoneuroni (Skourti-Stathaki et al., 2011). La SLA5, una forma giovanile a trasmissione recessiva, è stata associata a mutazioni nel gene *SPG11*, che mappa sul cromosoma 15q15-2 e che codifica per la spactasina; il suo accumulo negli assoni non mielinizzati determina delle alterazioni del trasporto assonale (Murmu et al., 2011). Altre mutazioni sono state riscontrate a carico del gene *VAPB*, associato a SLA8, con esordio giovanile, tremore posturale, fascicolazioni e deficit di forza agli arti con lenta progressione. VABP è una proteina adattatrice del reticolo endoplasmico che è coinvolta nel traffico intracellulare delle vescicole e nel trasporto dei lipidi (Qiu et al., 2013). La SLA9 presenta segni clinici classici ed è una forma autosomica dominante dell'adulto associata al gene *ANG*, che mappa sul cromosoma 14q11.2 e le cui mutazioni determinano un'alterazione dell'attività ribonucleotidica e della traslocazione nucleare (Padhi et al., 2012). Le inclusioni proteiche presenti nei pazienti SLA sono composte oltreché dalle proteine FUS, TDP-43 e SOD1 anche dall'optineurina, importante nei processi autofagici, le cui mutazioni sono responsabili della forma di SLA12 a trasmissione autosomico-dominante o recessiva, con esordio in età adulta e lenta progressione, il cui gene mappa sul cromosoma 10p13 (Korac et al., 2013). In una

famiglia italiana è stata identificata la SLA14, neuropatia motoria dell'adulto con trasmissione autosomica dominante, esordio agli arti e rapida progressione; responsabile di questa forma di malattia è la proteina VCP coinvolta in diverse funzioni cellulari e, tra queste, la regolazione dei meccanismi apoptotici (Johnson et al., 2010 (b)). Mutazioni in *UBQLN2* sono responsabili della SLA15, una forma giovanile X-linked, in cui i segni piramidali precedono il coinvolgimento del II motoneurone, ed in alcuni casi si accompagnano a demenza; il gene è localizzato sul cromosoma Xp11 e le mutazioni di *UBQLN2* sembrano alterare i processi di degradazione delle proteine, causando una elevata aggregazione proteica e neurodegenerazione (Daoud et al., 2011).

1.1.4.1 Eccitotossicità glutammatergica

È stato proposto che la SLA non sia una patologia isolata dei motoneuroni, ma che sia conseguente ad alterazioni nelle interazioni tra i motoneuroni e le circostanti cellule gliali (Corona et al., 2007). In particolar modo gli astrociti, ai quali era stata inizialmente attribuita solo una funzione di supporto morfostrutturale ai neuroni, sono implicati nella funzionalità neuronale, in quanto forniscono supporto trofico alle cellule neuronali e mediano un effetto tampone verso sostanze potenzialmente tossiche rilasciate a livello sinaptico durante l'attività neuronale, come il potassio ed il glutammato; studi di laboratorio hanno rivelato che le cellule gliali astrocitarie svolgono un ruolo chiave nella degenerazione neuronale (Maragakis et al., 2004; Haidet-Phillips et al., 2011). Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale (SNC) dei vertebrati, agisce attivando differenti tipi di recettori sulla cellula postsinaptica, ionotropici AMPA (acido α -amino-3idrossi-5metil-4-isoxazolepropionico) o NMDA (N-metil-D-aspartato) e metabotropici (Figura 2).

L'attività glutammatergica è regolata tramite inattivazione recettoriale e *re-uptake* del glutammato da parte delle cellule gliali, soprattutto a livello degli astrociti, grazie all'azione delle proteine trasportatrici *Excitatory Amino Acid Transporters* (EAATs) (Anderson e Swanson, 2000; Cluskey e Ramsden, 2001). Nel 1995, Rothstein descrisse difetti della segnalazione glutammatergica nel tessuto neuronale di pazienti SLA e questo fenomeno è stato poi attribuito alla perdita selettiva del trasportatore del glutammato EAAT2 negli astrociti.

Nella SLA, sia familiare che sporadica, si ritrovano infatti diminuiti livelli della proteina EAAT2 funzionante ed elevate concentrazioni di glutammato nel liquido cerebrospinale (Fray et al., 1998; Sasaki et al., 2000).

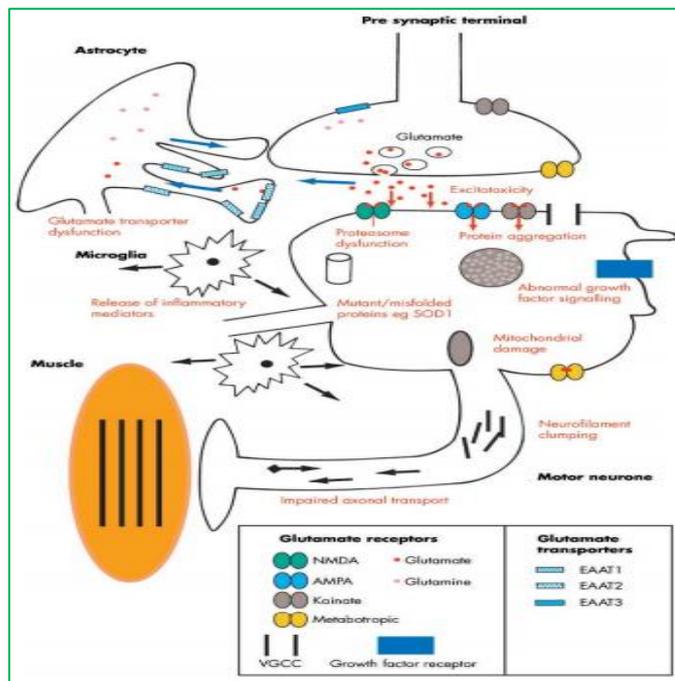


Fig.2 Meccanismi molecolari che possono contribuire alla motoneurodegenerazione (Shaw , 2005)

La sovrattivazione dei recettori glutammatergici AMPA porta ad ingresso di ioni sodio che determina depolarizzazione e attivazione dei recettori NMDA con influsso di calcio a livello intracellulare. Anche il recettore metabotropico, accoppiato ad una proteina G trimerica, induce una cascata di segnalazione con rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico. L'aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare porta all'attivazione di complessi enzimatici citotossici, quali peptidasi, lipasi, endonucleasi, nitrossidosintetasi, xantino-ossidasi, e questi processi possono danneggiare il neurone sia direttamente che attraverso la formazione di radicali liberi con conseguente morte cellulare (Rothstein, 1995; Bär, 2000). Il fenomeno viene di solito attribuito al glutammato, ma può essere indotto da molti altri amminoacidi endogeni quali l'acido aspartico, l'acido omocisteico e l'acido quisqualico (Lodge et al., 1988); infatti il concetto di eccitossicità, introdotto da John Olney, è definito come "fenomeno di sofferenza e morte cellulare indotto dalla liberazione incontrollata ed il conseguente accumulo, di neurotrasmettitori eccitatori, come l'acido glutammico" (Olney, 1978) ed è un processo patogenetico in seguito al quale la cellula nervosa risulta fortemente danneggiata (Struzyńska, 2009). Altra possibile disfunzione del trasporto del glutammato può derivare da un'alterazione funzionale dei trasportatori come diretta conseguenza di un danno ossidativo; i due fenomeni sono altamente correlati poiché l'eccitotossicità provoca nei motoneuroni produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che potrebbero danneggiare i trasportatori del glutammato negli astrociti (Rao e Weiss, 2004). Questa ipotesi è avvalorata dall'elevata concentrazione del trasportatore EAAT2 nei processi degli astrociti a diretto contatto con i motoneuroni, danneggiati nei pazienti SLA (Guo et al., 2003); quando gli astrociti in coltura subiscono il danno ossidativo il trasporto

di glutammato è compromesso, con conseguente danno neuronale eccitotossico (D'Amico et al., 2013). A conferma dell'importante ruolo dell'eccitotossicità nella patogenesi della SLA è il fatto che l'unico trattamento terapeutico oggi riconosciuto e approvato dalla *Food and Drug Administration* è il Riluzolo, farmaco antiglutammatergico che riduce il rilascio di glutammato attraverso tre meccanismi: inibisce la liberazione del glutammato dal terminale pre-sinaptico, lega in modo non competitivo i recettori N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e agisce direttamente sui canali del sodio voltaggio-dipendenti. Queste tre attività farmacologiche coordinate sembrano determinare un rallentamento della progressione della patologia con un aumento della sopravvivenza dai tre ai dodici mesi (Parakh et al., 2013; Harikrishnareddy et al., 2015).

1.1.4.2 Alterazioni mitocondriali

I mitocondri sono organelli cellulari che svolgono funzioni critiche all'interno della cellula; essi infatti, attraverso il processo della fosforilazione ossidativa (OXPHOS), forniscono un efficiente apporto energetico rappresentando il sito d'elezione per la produzione di ATP. Il loro ruolo come centrale energetica cellulare è emerso a partire dal 1960 (Mitchell et al., 1967). È stato successivamente dimostrato il loro coinvolgimento in processi come la trasduzione del segnale in risposta a stress metabolici (Tait et al., 2012), la produzione di radicali liberi come le ROS (Sena et al., 2012) e l'induzione della morte cellulare programmata (Galluzzi et al., 2012). Per mantenere l'omeostasi energetica la cellula deve garantire la presenza di una determinata popolazione mitocondriale in modo da sostenere le richieste energetiche e deve saper gestire i prodotti ed i sottoprodotti delle reazioni necessarie a tale scopo. La disregolazione di questi processi e le disfunzioni mitocondriali sembrano giocare un ruolo fondamentale nella fisiopatologia di diverse condizioni dell'organismo umano, come il cancro (Wallace, 2012), la neurodegenerazione (Martin, 2012) e l'invecchiamento (Niccoli et al., 2012). La disfunzione mitocondriale è sempre stata riconosciuta come uno dei principali candidati nella patogenesi della SLA dato che sia in modelli murini della malattia che nei pazienti sono state riscontrate alterazioni nella struttura mitocondriale, disfunzioni nella catena di trasporto degli elettroni (ETC), soprattutto nei complessi I e IV, e difetti di importazione delle proteine mitocondriali (Figura 3); queste alterazioni conducono a squilibrio energetico con aumento dello stress ossidativo, alterata mobilizzazione del calcio e induzione dell'apoptosi (Cozzolino e Carri, 2012; Tan et al., 2014).

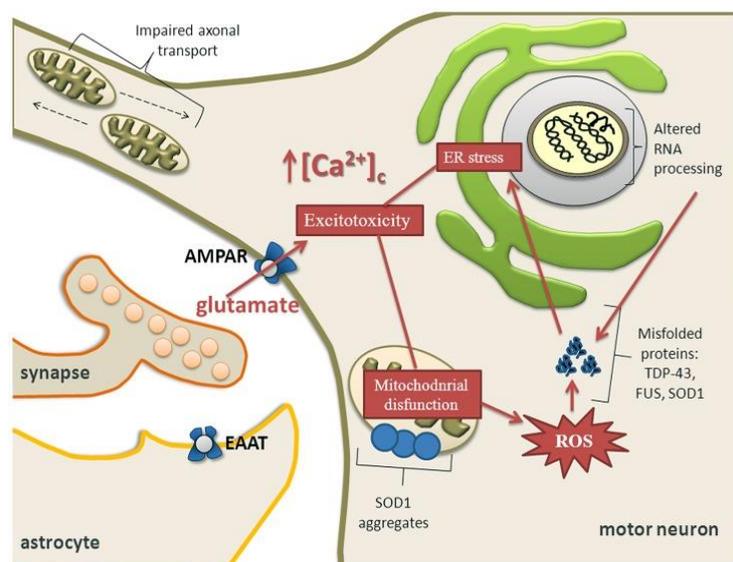


Fig.3: Eccitotossicità nei motoneuroni prodotta dalle disfunzioni mitocondriali e dallo stress del reticolo endoplasmatico (RE). Le ROS generate a livello mitocondriale contribuiscono al ripiegamento aberrante delle proteine che accumulate portano a stress del RE (Tadic. et al., 2014).

Dato che questi difetti possono essere rilevati prima della comparsa dei sintomi si ritiene che i mitocondri abbiano un ruolo primario nella determinazione della malattia e nella motoneurodegenerazione (MD) (Cozzolino et al., 2015). Sono stati osservati, in modelli murini di SLA, mitocondri alterati e vacuolizzati per lo più nei dendriti, nei corpi cellulari e in alcuni assoni dei neuroni delle corna anteriori del midollo spinale (Bendotti et al., 2001). La neurodegenerazione sembra essere anche legata alle proteine responsabili o associate ai casi familiari, le quali hanno un ruolo nella funzionalità mitocondriale. I mitocondri potrebbero essere i primi siti danneggiati nei topi SODG93A con accumulo nello spazio intermembrana di ioni rame (Okado-Matsumoto e Fridovich, 2002). È stato dimostrato che la MD può seguire l'accumulo di aggregati proteici di SOD1 *misfolded* con proteine mitocondriali (Israelson et al. 2010); tali aggregati si accumulano anche sul versante citoplasmatico della membrana mitocondriale esterna e si legano direttamente al canale anionico voltaggio-dipendente (VDAC), depolarizzando la membrana e perturbando il normale funzionamento della ETC (Vielhaber et al., 2000; Redler e Dokholyan, 2012). VAPB regola le interazioni fra mitocondrio e reticolo endoplasmatico e la optineurina è reclutata a livello dei mitocondri danneggiati e aiuta il loro *turnover* tramite mitofagia; data la loro funzione, mutazioni in queste proteine possono perturbare la funzionalità mitocondriale (Cozzolino et al., 2015; Stoica et al., 2014; Wong e Holzbaur, 2014). Modelli murini mostrano denervazione e degenerazione muscolare, accompagnata da un ampio accumulo di mitocondri anomali nello spazio inter-miofibrillare, con lenta perdita di motoneuroni dovuta ad accumulo di TDP-43 (Nalbandian et al., 2013).

La SLAs è legata anche a mutazioni nel DNA mitocondriale, responsabili delle alterazioni della funzionalità dei complessi della ETC (Redler e Dokholyan, 2012). Il mitocondrio alterato a livello morfo-funzionale può essere sede di produzione di ROS e allo stesso tempo esserne bersaglio; è dunque evidente come i due fenomeni, stress ossidativo ed alterazioni mitocondriali, siano strettamente correlati (Carrì et al., 2015).

1.1.4.3 Stress ossidativo e relativi biomarcatori

La comunità scientifica ha rivolto l'attenzione verso lo stress ossidativo come potenziale fattore di rischio per l'insorgenza della SLA quando, nel 1969, venne identificato il gene SOD1 come causativo della malattia (McCord et al., 1969; McCord et al. 1971).

Durante la respirazione aerobica, il metabolismo cellulare e la difesa contro agenti patogeni vengono prodotte specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS e RNS); tra tutti gli organelli in grado di generare ROS all'interno della cellula, i mitocondri sono i siti principali, responsabili per oltre il 90% della loro produzione (Niedzielska et al., 2015). A concentrazioni fisiologiche, ROS e RNS giocano un'importante funzione come mediatori e regolatori cellulari, ma data la loro elevata reattività, concentrazioni troppo alte portano ad una catena di reazioni che danneggia le molecole biologiche come lipidi, proteine ed acidi nucleici. La perdita dell'equilibrio tra la produzione delle ROS e la loro detossificazione, ad opera del sistema di difesa antiossidante, porta inizialmente ad alterazione dell'equilibrio redox cellulare e, infine, allo sviluppo della condizione nota come stress ossidativo (Niedzielska et al., 2015).

Sono stati osservati alterati livelli dei biomarcatori di stress ossidativo nei pazienti con SLAs e questo potrebbe indicare che un'alterazione dello stato ossidoriduttivo cellulare sia rilevante per la patogenesi di questa malattia (D'Amico et al., 2013). In effetti, analisi autoptiche del tessuto neuronale di pazienti con SLAs dimostrano la presenza di danno ossidativo alle proteine, lipidi e DNA, suggerendo che l'insulto ossidativo possa essere, probabilmente, uno dei principali meccanismi cellulari di degenerazione dei motoneuroni (Agar et al., 2003; D'Amico et al., 2013). Lo stress ossidativo, alterando la struttura e la conformazione delle proteine, può provocare l'accumulo delle inclusioni proteiche anomale osservate sia in modelli murini che in tessuti autoptici di pazienti SLA (Carrì et al., 2015). Nei linfociti dei pazienti con SLAs, infatti, è stata ritrovata la proteina SOD1 *wild-type* con modifiche post-traduzionali, iper-ossidata e con proprietà tossiche in quanto in grado di formare complessi con la proteina Bcl-2 e indurre così danno mitocondriale (Guareschi et al., 2012). Recenti studi in vitro dimostrano che lo stress ossidativo promuove la formazione di ponti disolfuro anomali fra residui di cisteina nella proteina TDP-43, in uno dei suoi domini di *RNA-binding*, con riduzione della sua solubilità e promozione dell'aggregazione (Cohen et al., 2012; Shodai et al., 2013). Le evidenze presenti in

letteratura dimostrano come lo stress ossidativo sia intimamente legato ad una serie di eventi cellulari nei motoneuroni che contribuiscono alla degenerazione e morte neuronale, anche se resta ancora da chiarire se lo stress ossidativo sia una causa della degenerazione neuronale o ne sia una conseguenza diretta (D'amico et al., 2013).

La severità degli effetti dello stress ossidativo può essere valutata attraverso l'analisi di biomarcatori in tessuti e fluidi biologici (D'Amico E. et al., 2013). Un biomarcatore è definito come una sostanza quantificabile, particolarmente resistente alla degradazione, utilizzata quale indicatore di un particolare stato biologico, normale o patologico, o come indice di risposta ad una terapia farmacologica o ad uno stimolo di tipo meccanico o chimico (Finsterer, 2012). L'analisi diretta delle ROS e delle RNS è estremamente difficile a causa della loro elevata reattività e breve emivita. Lo studio dello stress ossidativo si avvale, quindi, principalmente di metodi in grado di rilevare i prodotti delle alterazioni indotte su proteine, lipidi e DNA (Tarpey et al., 2004).

Il processo di ossidazione delle proteine generalmente comporta l'introduzione di nuovi gruppi funzionali che possono contribuire ad alterare la funzione e il metabolismo delle stesse (Dean et al., 1997). Gli studi sulle modificazioni ossidative delle proteine hanno dimostrato una serie di conseguenze irreversibili incluse frammentazione, alterazione della struttura tridimensionale e aggregazione, che comportano perdita funzionale (Davies et al., 1999). I residui aminoacidici più sensibili all'ossidazione sono quelli contenenti gruppi aromatici o tiolici, ma anche i residui alifatici sono soggetti a fenomeni di ossidazione. I principali biomarcatori di ossidazione delle proteine sono i prodotti di ossidazione della tirosina (Tyr) che rappresentano un marcatore di danno radicalico diretto sulle proteine/amminoacidi, e i gruppi carbonilici che possono generarsi anche in conseguenza a perossidazione lipidica e glicio-ossidazione (Vlassara, 1994). Un altro marker di danno ossidativo che permette di valutare la quantità di proteine modificate da processi di ossidazione sono i prodotti di ossidazione avanzata delle proteine (AOPP). Questi consistono in un insieme di proteine, tra cui la tiroglobulina, la γ -globulina, l'albumina e la mioglobulina (Witko-Sarsat et al., 1996), la cui elettroforesi mostra un picco ad alto peso molecolare, prevalentemente dovuto all'albumina, che appare sotto forma di aggregati, probabilmente derivati da ponti disolfuro e/o da "cross-linking" della tirosina, mentre il picco di AOPP a basso peso molecolare contiene albumina nella sua forma monomericamente (Witko-Sarsat et al., 1996). Gli AOPP possono formarsi in seguito ad esposizione con l'acido ipocloroso (HOCl) (Witko-Sarsat, 1996), un potente ossidante che, in condizioni fisiologiche, viene prodotto mediante una reazione tra lo ione cloruro (Cl^-) e il H_2O_2 ; tale reazione è catalizzata dall'enzima mieloperossidasi (MPO), secreto dai neutrofili (Fu et al., 2000). La MPO è responsabile della produzione degli AOPP sia tramite l'attività del 2HOCl , sia tramite l'attività diretta dell'enzima

stress (Noyan et al., 2006). L'azione dell'HOCl sulle proteine plasmatiche è responsabile della produzione di proteine clorinate e clorammine (Witko-Sarsat et al., 1998). Alcuni di questi intermedi hanno un'emivita molto breve e vengono facilmente idrolizzati a formare aldeidi, ammoniaca ed anidride carbonica con conseguente rapido incremento dei carbonili totali (Hawkins e Davies, 1998). La MPO, invece, agendo direttamente sui residui di tirosina, contribuisce alla formazione dei dimeri di tirosina, tipici delle proteine ossidate, con conseguente aumento dell'aggregazione proteica (Fu et al., 2000). È stato osservato che l'aumento degli AOPP è correlato ad una diminuita concentrazione del glutatione ridotto (GSH) (Witko-Sarsat et al., 1996). Successivamente, è stato dimostrato che, in vivo, i livelli plasmatici degli AOPP correlano con i livelli di dimeri di tirosina e con la pentossidina, un prodotto di glicosilazione strettamente associato al danno ossidativo delle proteine (Capeillère-Blandin et al., 2004). Inoltre, i valori degli AOPP sono associati con i livelli della Gamma Glutamyl Transferasi (GGT), un enzima noto per catalizzare la formazione dei radicali liberi e, quindi, per indurre un incremento del danno ossidativo, determinando il rilascio di un catabolita, il dipeptide cistenilglicina, estremamente efficiente nel ridurre i cationi metallici, tra cui il Ferro (Franzini et al., 2010).

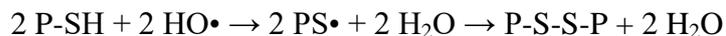
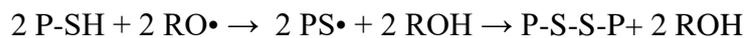
Il principale effetto dello stress ossidativo a carico dei lipidi è la perossidazione lipidica; a seguito della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi, i relativi idroperossidi sono convertiti in composti più stabili, ad esempio in aldeidi come la malondialdeide (MDA) e il 4-idrossinonenale (4-HNE) (Esterbauer e Cheeseman, 1990), il quale induce un danno cellulare attraverso inibizione della sintesi del DNA, dell'RNA e delle proteine, della catena respiratoria e della glicolisi (Ferrali et al., 1980). Una particolare classe di composti generati durante la LPO a carico dell'acido arachidonico sono gli isoprostani (IsoPs); in particolare, gli F2-isoprostani (F2-IsoPs) sono la classe più studiata come marcatore di LPO perché aumentano in funzione del grado di stress ossidativo, sono chimicamente stabili nei fluidi biologici e non sembrano essere influenzati dai lipidi contenuti nella dieta (Roberts e Morrow, 2000; Montuschi et al., 2004; Morrow, 2005).

L'attacco delle ROS, soprattutto del radicale idrossile, sugli acidi nucleici può causare mutazioni su specifiche basi e anche rottura della doppia elica. Una delle più frequenti alterazioni ossidative delle basi puriniche riguarda l'ossidrilazione in posizione 8 della guanosina e il distacco delle basi azotate dagli zuccheri; l'8-idrossi-deossiguanosina (8-HdG), quindi, è considerata una misura dell'ossidazione del DNA in risposta ai radicali liberi. Questo marcatore, tuttavia, rappresenta una misura parziale di danno al DNA in quanto interessa solo i residui di guanina e i suoi precursori (Halliwell e Whiteman, 2004).

L'organismo, per difendersi dagli insulti ossidativi, si avvale dell'azione di molecole antiossidanti, definite come "qualsiasi sostanza che, presente in concentrazione molto bassa rispetto a quella di un substrato ossidabile, è in grado di ritardare o inibire significativamente l'ossidazione di quel substrato" (Halliwell e Gutteridge, 1995); gli antiossidanti sono classificati in esogeni ed endogeni; questi ultimi si distinguono in enzimatici e non enzimatici (Antolovich et al., 2002). I principali enzimi deputati alla difesa dal danno ossidativo delle ROS sono la SOD, la catalasi (CAT) e la glutazione perossidasi (GPX); queste proteine fanno parte della famiglia delle ossidoreduttasi e agiscono in modo cooperativo o sinergico (Michiels et al., 1994; Valko et al., 2006). Le superossido dismutasi (SOD) sono tre isoenzimi caratterizzati da diversa compartimentalizzazione cellulare: la Cu, Zn-SOD (SOD1) è presente principalmente nel citosol e nello spazio intermembrana, la Mn-SOD (SOD2) è presente nei mitocondri (Bannister et al. 1987) e una terza forma di SOD si trova nei fluidi extracellulari (SOD3) e contiene rame e zinco nel sito attivo (Nozik-Grayck et al. 2005). La loro attività catalitica è finalizzata alla dismutazione dell'anione superossido con produzione di ossigeno molecolare e perossido di idrogeno (Bannister et al. 1987; Zelko et al. 2002). La catalasi è una proteina enzimatica tetrameric, ad alto peso molecolare, contenente porfirina nel sito attivo, la cui funzione principale è quella di proteggere la cellula dal H₂O₂ convertendolo in acqua ed ossigeno molecolare. Nonostante l'enzima non sia essenziale per alcuni tipi di cellule in condizioni fisiologiche, diventa fondamentale nell'acquisizione di tolleranza alla condizione di stress ossidativo nella risposta adattativa delle cellule (Izawa et al., 1996). La Glutazione Perossidasi (GPX) è uno degli enzimi fondamentali nella detossificazione del perossido di idrogeno. Si tratta di un enzima selenio-dipendente che converte H₂O₂ o gli idroperossidi organici ad acqua o alcoli (ROH) rispettivamente, agendo in coniugazione con il glutazione (GSH).

Tra gli antiossidanti non enzimatici sono compresi il coenzima Q, il glutazione (GSH), le vitamine A, E e C, l'acido ascorbico e lipoico, polifenoli e carotenoidi e agenti chelanti (Uttara, 2009). Di questi, il glutazione sembra essere il più importante, in quanto riduce i processi di perossidazione lipidica bloccando direttamente l'attività delle ROS. Inoltre, il glutazione è importante per mantenere la vitamina E e la vitamina C in forma ridotta, conferendo loro proprietà antiossidanti (Valko et al., 2006). Il glutazione ridotto (GSH) è il più importante antiossidante tiolico presente a livello intracellulare (Valko et al., 2006). Gli antiossidanti non enzimatici hanno la funzione di implementare le difese antiossidanti enzimatiche, ripristinando, ad esempio, il pool dei tioli oltre ad agire come *scavenger* dei radicali liberi. Le proteine tioliche totali rappresentano una componente qualitativamente significativa della barriera antiossidante plasmatica. Infatti, i gruppi sulfidrilici (-SH) delle molecole plasmatiche, possono opporsi alla

propagazione dei processi perossidativi inattivando i radicali alcossilici (RO•) ed idrossilici (HO•).



Considerando l'evento dal punto di vista stechiometrico, due residui tiolici possono ossidare una coppia di RO• o HO•, cedendo ad essa due elettroni (sotto forma di due atomi di idrogeno). In questo modo ambedue i tipi di radicali vengono inattivati: i primi sono rilasciati come molecole di alcool mentre i secondi come molecole di acqua; i gruppi tiolici si ossidano generando ponti disolfuro (Hu, 1994). In questo modo, i residui tiolici presenti nelle proteine, contrastano l'attacco dei radicali liberi. La formazione di legami S-S può avere, però, conseguenze indesiderate, ad esempio la formazione di un ponte disolfuro fra i residui di cisteina di due diverse proteine può portare ad una sorta di “polimerizzazione”. Se il ponte disolfuro, invece, si forma nell'ambito della stessa catena, la proteina può modificare stabilmente la sua conformazione. In ambedue i casi è possibile che le proteine coinvolte subiscano un'alterazione delle proprie capacità funzionali. Il saggio per la valutazione dei tioli plasmatici basa sulla capacità dei gruppi -SH di sviluppare un complesso colorato, determinabile fotometricamente, quando reagiscono con l'acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) secondo il metodo inizialmente proposto da Ellman nel 1959 e successivamente adattato da Hu nel 1994. La valutazione dei tioli permette di avere una stima indiretta del valore di glutatione ridotto nel plasma. Questa molecola infatti, grazie al suo gruppo tiolico libero, rappresenta il principale meccanismo protettivo contro lo stress ossidativo, essendo il più potente tra gli antiossidanti prodotti dall'organismo.

Nel plasma o nel siero ritroviamo una serie di molecole antiossidanti insieme a proteine plasmatiche, quali albumina, ferritina, bilirubina e tutta una serie di piccole molecole quali acido L-ascorbico (vitamina C), α -tocoferolo (vitamina E), carotenoidi e acido urico (Cao et al., 1998). Il potere antiossidante del plasma non si può definire come una semplice somma delle attività delle varie sostanze antiossidanti, bensì come un equilibrio dinamico influenzato dalle interazioni tra le diverse porzioni antiossidanti. Questa cooperazione tra le varie sostanze risulta essere la maggior protezione nei confronti dell'attacco da parte dei radicali liberi. In special modo, tra le molecole sopra citate, l'acido urico apporta il contributo maggiore a quello che viene definito potere antiossidante del plasma (Koracevic et al., 2001); infatti, è in grado di reagire con i radicali liberi formando il radicale urato, relativamente stabile, che interrompe le reazioni radicaliche (Rodonev, 2003).

I metodi per la valutazione globale del potere antiossidante del plasma si basano sul rationale che la riduzione della concentrazione/attività di uno o più componenti biochimici preposti alla neutralizzazione delle specie ossidanti in un determinato sistema biologico è indicativo di un'alterazione del bilancio ossidativo. In genere questo tipo di valutazione si effettua su fluidi extracellulari, soprattutto su plasma o siero, e costituisce un approccio vantaggioso, in quanto, il dosaggio contemporaneo di più antiossidanti è considerato uno strumento tecnicamente valido perché molti dei componenti di questo sistema di difesa lavorano tra loro in concerto (Huang et al., 2005). Uno dei metodi per la valutazione del potere antiossidante plasmatico è il test *Ferric Reducing Antioxidant Power*, potere antiossidante ferro-riducente (FRAP). Il metodo FRAP, sviluppato da Benzie e Strain, si basa sulla capacità del plasma di ridurre il complesso Fe(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a complesso Fe(II)-TPTZ, colorato in blu (assorbanza massima a 595 nm) (Benzie and Strain, 1996). La reazione consente di misurare la capacità antiossidante di agenti riducenti con potenziali redox inferiori a 0.7 Volt e, quindi, in ordine decrescente: l'acido urico (60%), l'acido ascorbico (15%), le proteine (10%), l' α -tocoferolo (5%), la bilirubina (5%) ed altre sostanze/attività non identificate (5%). La capacità ferro-riducente del plasma (FRAP) è un marker che fornisce una stima del potere antiossidante plasmatico, in funzione della capacità del campione ematico di ridurre un metallo di transizione, generalmente il ferro (Benzie and Strain, 1996).

1.2 NUCLEAR FACTOR ERYTHROID 2-RELATED FACTOR 2 (NRF2)

Numerose evidenze in letteratura suggeriscono che le specie chimiche reattive e le sostanze elettrofile possono avere un ruolo importante nell'indurre diversi meccanismi causativi di vari quadri patologici come la tumorigenesi, le malattie a carico del sistema cardiovascolare, del sistema nervoso centrale e periferico (Kohen e Nyska, 2002; Nguyen et al., 2004). L'organismo umano, al fine di neutralizzare tali sostanze tossiche, ha sviluppato una pletera di meccanismi di difesa (Lee et al., 2005; Sykiotis e Bohmann, 2010). Tra questi, la via mediata dal fattore di trascrizione *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nfe2l2), noto anche come Nrf2, è attualmente riconosciuta come uno dei principali *pathway* di difesa cellulare contro lo stress indotto sia da sostanze pro-ossidanti che xenobiotiche (Friling et al., 1990; Dinková-Kostova e Amramov, 2015). Nrf2, inizialmente identificato come regolatore dell'espressione dei geni per le beta-globine (Moi et al., 1994), nel nucleo, modula l'attivazione trascrizionale dei suoi geni bersaglio legandosi ad una sequenza nucleotidica chiamata *Antioxidant Response Element* (ARE), identificata per la prima volta nelle regioni regolatorie dei geni codificanti per la glutatione S-transferasi (GST) e per la NAD [P] H: chinone ossidoreduttasi-1 (NQO1) nel ratto e nel topo (Rushmore et al., 1991). Gli ARE sono *enhancer* contenenti una sequenza consenso 5'-

TGACnnnGC-3' presente, talvolta anche in copie multiple, a livello del promotore di geni chiamati ARE-dipendenti. Tra i geni regolati da Nrf2 troviamo quelli che codificano per enzimi antiossidanti e per enzimi di detossificazione di fase II, come l'eme ossigenasi-1 (HO-1), la NQO1, la catalasi, la SOD e le proteine implicate nella sintesi e nel metabolismo del glutatione (alcune proteine della famiglia delle Glutatione-S-transferasi (GSTs) e la γ -glutamyl cisteina ligasi (γ -GCL)) (Kundu e Surh, 2008). Il coinvolgimento di Nrf2 nell'espressione, sia basale che inducibile, dei geni ARE-dipendenti lo rende il principale regolatore della risposta antiossidante e un modulatore di numerosi processi apparentemente indipendenti, quali la risposta immunitaria ed infiammatoria, il rimodellamento tissutale e la proliferazione cellulare (Hyberston et al., 2011).

Nrf2 appartiene ad una famiglia di fattori di trascrizione del tipo *Cap'n'Collar-basic leucine zipper* (CNC-bZIP), comprendente altri 3 membri: p45 NFE2, Nrf1 ed Nrf3 (Moi et al., 1994; Sykiotis et al., 2011). La proteina contiene 605 amminoacidi e presenta un peso molecolare di 67.7 kDa; l'analisi della sequenza amminoacidica ha permesso di identificare sette domini, altamente conservati lungo la scala evolutiva, chiamati domini *Nrf2-ECH homology* (Neh) (Itoh et al., 1995) (Figura 4).

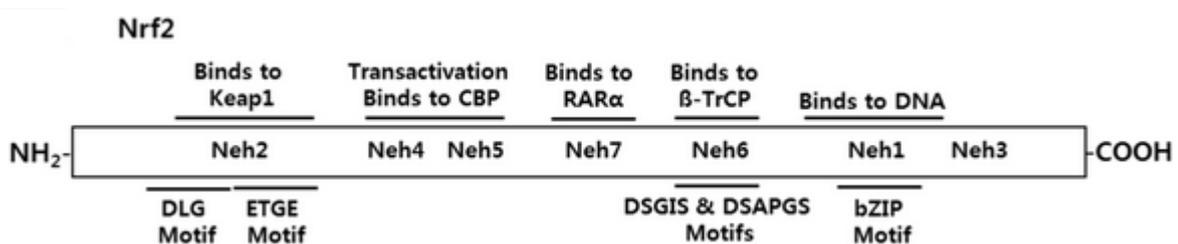


Fig 4: I sette domini conservati di Nrf2 (Neh1-7) (Keum e Choi, 2014)

Il dominio Neh1 contiene il motivo CNC-bZIP, così definito per l'elevata omologia con il dominio bZIP del fattore di trascrizione CNC della *Drosophila melanogaster* (Mohler et al., 1991); il motivo bZIP è costituito da una regione basica di DNA-binding, necessaria al legame di Nrf2 con le sequenze ARE, e da una regione strutturale a cerniera di leucina che consente la formazione del dimero tra Nrf2 e le proteine Small *musculoaponeurotic fibrosarcoma* (Maf). Il dominio Neh1, inoltre, interagendo con il complesso UbcM2-E2 ubiquitina, regola la stabilità della proteina (Plafker et al., 2010). Il dominio Neh2 regola negativamente la proteina interagendo con *Kelch-like erythroid-cell-derived protein with CNC homology (ECH)-associated protein 1* (Keap1) attraverso i motivi DLG ed ETGE (Niture et al., 2014; Moi et al., 1994; Dinkova-Kostova et al., 2015). Il dominio Neh3 permette la transattivazione di Nrf2 mediante l'interazione con la proteina di rimodellamento della cromatina CHD6 (Nioi et al., 2005). I

domini Neh4 e Neh5 sono anch'essi deputati alla transattivazione di Nrf2 tramite legame con coattivatori trascrizionali come la *CREB binding protein* (CBP) (Katoh et al., 2001). Il dominio Neh6 possiede due motivi, chiamati DSGIS e DSAPGS, costituenti una piattaforma per il legame, fosforilazione-dipendente, della β -*transducing-repeat-containing protein* (β -TrCP), una delle proteine coinvolte nella degradazione di Nrf2 (McMahon et al., 2004). Recentemente è stato identificato il dominio Neh7 che interagisce con il recettore α acido retinoico (RAR α) e reprime l'espressione dei geni target di Nrf2 (Wang et al., 2013).

Il principale meccanismo di regolazione di Nrf2 è stato descritto da Itoh e collaboratori (1999) e coinvolge (Keap1) che agisce come soppressore del fattore di trascrizione; Keap1, infatti, è una proteina citoplasmatica che, legando Nrf2 a livello del dominio Neh2, ne impedisce la traslocazione al nucleo e quindi l'accesso ai promotori dei geni contenenti gli elementi ARE (Itoh et al., 1999); questa repressione è fondamentale quando, in assenza dell'adeguato stimolo di stress, non è necessario indurre attivazione genica. Keap1 permette così di regolare la localizzazione intracellulare di Nrf2 fra citoplasma e nucleo (Itoh et al., 2003; McMahon et al., 2003; Zhang e Hannink., 2003). Keap1 presenta, tra la regione amino-terminale (NTR) e la regione carbossilica terminale (CTR), una regione intermedia (IVR), un dominio *double glycine repeats* (DGR) deputato a legame di Keap1 con Nrf2 e con l'actina citoscheletrica o con la miosina VII, un dominio *Bric-a-brac Tramtrack Broad-complex* (BTB) necessario per la dimerizzazione della proteina, in modo tale che due domini BTB vicini siano in grado di legare Cullin-3 (Kang et al., 2004; Keum e Choi, 2014) (Figura 5).

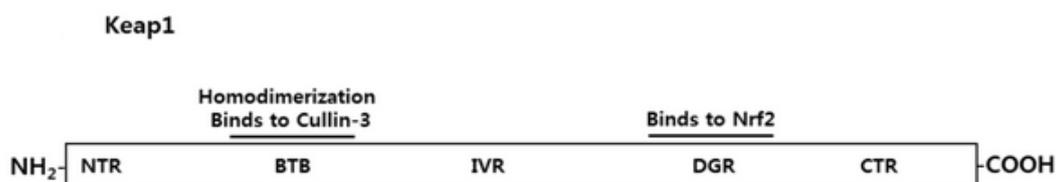


Fig 5: I 5 domini di Keap1 (Keum e Choi, 2014)

Per spiegare il meccanismo con cui Keap1 regola l'attività di Nrf2 sono stati proposti due modelli. Secondo il modello "*hinge and latch*" (Figura 6) è presente, contemporaneamente, un'interazione ad alta affinità tra il motivo ETGE di Nrf2 ed il dominio DGR di un monomero Keap1 (*hinge*) e un'interazione a bassa affinità fra il dominio DLG di Nrf2 ed il dominio DGR dell'altro monomero (*latch*). Quest'ultimo legame, al contrario del primo, è regolato dalla presenza di induttori di Nrf2 (Urano 2011). Keap1, grazie al dominio BTB, si comporta come adattatore per il complesso Cullin3/Ring Box1 E3-ubiquitina ligasi, e la sua stretta interazione con Nrf2 permette il legame dell'ubiquitina ligasi E3 alla porzione N-terminale di Nrf2; in

questo modo Keap1 contribuisce ad una costante poliubiquitinazione di Nrf2, a livello di residui di lisina presenti nei domini ETGE e DLG, inducendone la degradazione nel proteasoma 26 S (Zhang et al., 2004; Furukawa et al., 2005). È stato ipotizzato che in presenza di induttori di Nrf2 si perda il legame a bassa affinità DLG-DGR; questa rottura crea un cambio conformazionale che interferisce con il processo degradativo di Nrf2 proteasoma-dipendente. In tale situazione Nrf2 si accumula nel citoplasma, trasloca nel nucleo ed attiva la trascrizione dei geni ARE-dipendenti (Keum e Choi, 2014).

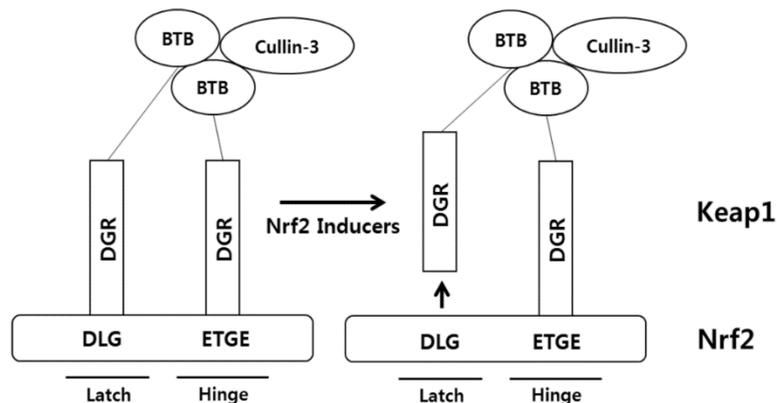


Fig 6: Regolazione di Nrf2 dipendente da Keap1 secondo il modello “hinge and latch” (Keum e Choi, 2014).

Recentemente Baird e colleghi (2014) hanno studiato l'interazione molecolare tra Nrf2 e Keap1 in vitro. I risultati di tale lavoro hanno messo in evidenza che il complesso Keap1/Nrf2 esiste in due diverse conformazioni: una conformazione aperta, nella quale Nrf2 è legata solo al DGR di un monomero Keap1, tramite il motivo ad alta affinità ETGE, e una conformazione chiusa nella quale entrambi i motivi DLG ed ETGE sono legati rispettivamente al dominio DGR di ciascuna proteina Keap1 del dimero (Baird et al., 2014). I ricercatori hanno quindi proposto il modello chiamato “*conformational cycling model*” o “*cyclic sequential attachment and regeneration model*” (Figura 7) secondo il quale Nrf2, in condizioni basali, si lega in modo sequenziale al dimero Keap1-Keap1, prima attraverso il motivo ETGE ad alta affinità, poi attraverso il motivo DLG a bassa affinità. In tale conformazione Nrf2 subisce ubiquitinazione e conseguente degradazione nel proteasoma. Il dimero Keap1-Keap1 così, libero dal legame con Nrf2, viene rigenerato ed è quindi in grado di legarsi al neo tradotto Nrf2 dando avvio ad un nuovo ciclo.

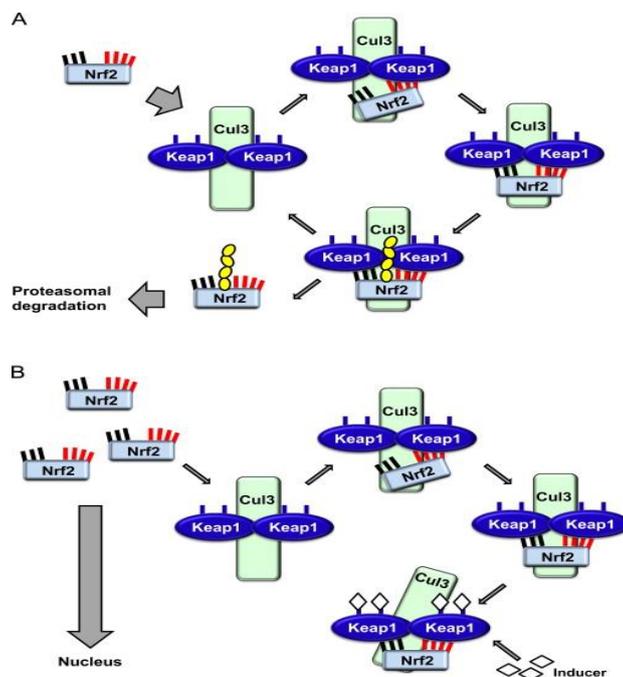


Fig 7: Regolazione di Nrf2 dipendente da Keap1 secondo il modello “conformational cycling model”; in rosso il dominio ETGE, in blu il dominio DLG (Dinková-Kostova e Amramov, 2015).

Gli induttori di Nrf2 promuovono la stabilizzazione di una conformazione chiusa “alterata” (Baird et al., 2014); infatti, il loro legame alle cisteine di Keap1 porta ad un cambio conformazionale che modifica negativamente la sua capacità di funzionare come adattatore per il complesso Cullin3/Ring Box1 E3-ubiquitina ligasi. In tale condizione Nrf2 di nuova sintesi non è in grado di legare Keap1, a causa della mancanza di dimeri Keap1-Keap1 disponibili; Nrf2 è quindi libero di traslocare nel nucleo e attivare l'espressione dei geni ARE-dipendenti (Baird et al., 2014; Keum e Choi, 2014).

L'attivazione di Nrf2 sembra dipendere da meccanismi che aumentano la stabilità del fattore di trascrizione, portando al suo accumulo nella cellula. La proteina, infatti, in condizioni basali ha una breve emivita che, in presenza di induttori aumenta, passando da 7-15 min a 30-100 min (Nguyen et al., 2003; McMahon et al., 2004). Queste sostanze induttrici possono essere molecole endogene, come le specie reattive (ROS e RNS), le prostaglandine e l'NO, o agenti esogeni, come metalli pesanti, composti elettrofili, xenobiotici e sostanze fitochimiche, ad esempio la genisteina, la quercetina, la curcumina e sulforafano (SFN). Tali induttori differiscono notevolmente nella struttura, anche se condividono alcune proprietà chimiche; ad esempio, sono in grado di modificare i residui tiolici a livello delle cisteine di Keap1 tramite ossidazione, riduzione o alchilazione. La modifica chimica in questi residui sensori provoca un cambio conformazionale tale da indurre la dissociazione di Nrf2 da Keap1 (Motohashi e Yamamoto, 2004; Wakabayashi et al., 2004). Il significato funzionale dei diversi residui di cisteina di Keap1

è stato esaminato tramite esperimenti di mutagenesi sito-specifica (Zhang e Hannink, 2003; Yamamoto et al., 2008; Takaya et al., 2012); i risultati suggeriscono che le diverse sostanze chimiche possono legare diversi residui di cisteina e in tal modo il sistema Keap1-Nrf2 è in grado di rispondere ad una vasta gamma di stimoli (Suzuki et al., 2013). In particolare alcuni residui di cisteina (Cys 151, Cys 273, Cys 288) sono stati identificati come i sensori diretti per elettrofili ed ossidanti (Figura 8); Keap1 può essere quindi considerato il sensore dello stress ossidativo (Dinkova-Kostova et al., 2002).

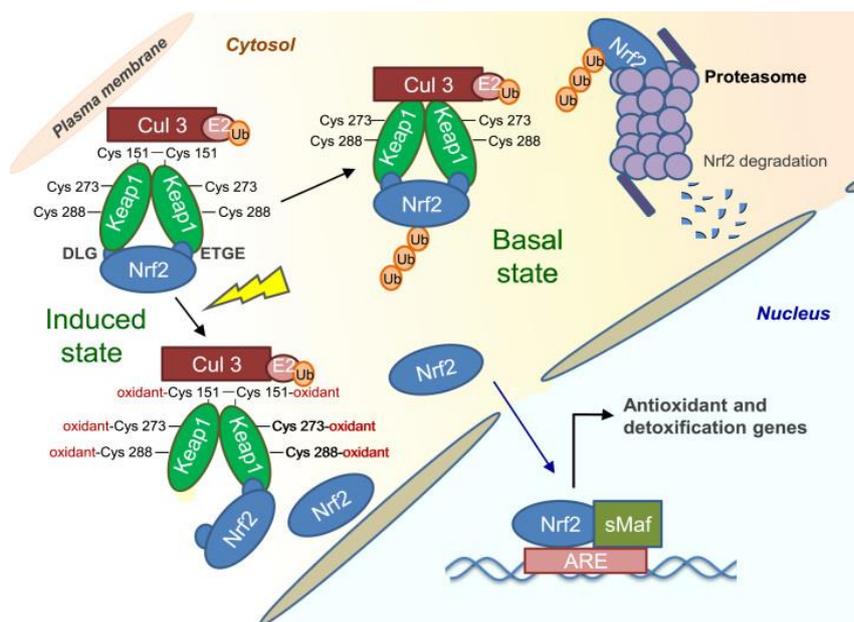


Fig 8: Regolazione di Nrf2 dipendente da Keap1. In condizioni basali Nrf2 è sequestrato nel citoplasma da un omodimero di Keap1 che facilita l'ubiquitinazione e la degradazione di Nrf2 nel proteasoma. In presenza di induttori che reagiscono con specifici residui di cisteina di Keap1, si ottiene il rilascio di Nrf2 e la sua traslocazione nucleare. Nel nucleo, Nrf2 eterodimerizza con piccole proteine Maf e si lega all'elemento di risposta antiossidante (ARE), attivando l'espressione di una batteria di geni citoprotettivi (Espinosa-Diez et al., 2015).

Nrf2 può essere modulato anche da altri meccanismi; ad esempio, la proteina chinasi C (PKC), attivata da trasduttori del segnale intracellulare o dalle stesse ROS, è in grado di fosforilare il residuo di serina 40 di Nrf2, compromettendone il legame a Keap1 (Huang et al., 2002; Osburn e Kensler, 2008). Le diverse vie di attivazione possono quindi regolare la traslocazione del fattore di trascrizione nel nucleo, all'interno del quale Nrf2 si lega agli elementi ARE, a monte dei suoi geni bersaglio, attivando la loro trascrizione. Per interagire con gli elementi ARE, Nrf2 deve formare un eterodimero con una delle *Small Maf Proteins*. La sequenza ARE è presente nel promotore di un elevato numero di geni che hanno in comune la codifica di proteine coinvolte nella protezione contro lo stress ossidativo (Dinkova-Kostova e Abramov, 2015). È stato dimostrato che in condizioni fisiologiche Nrf2 incide sul potenziale di membrana mitocondriale,

sull'ossidazione degli acidi grassi, sulla disponibilità di substrati per la respirazione (NADH e FADH₂ / succinato) e sulla sintesi dell'ATP; in condizioni di stress ossidativo l'attivazione di Nrf2 contrasta l'aumento della produzione di ROS nei mitocondri (Nioi et al., 2003; Dinkova-Kostova et al., 2015). Inoltre, sebbene la risposta primaria a bassi livelli di ROS sia modulata dalla cooperazione di tre vie, mediate da Nf- κ B, AP1, e dalle MAPK, un loro aumento improvviso provoca l'attivazione del *pathway* Nrf2-Keap1 che induce un aumento delle difese antiossidanti, necessarie per minimizzare il danno ossidativo (Espinosa-Diez et al., 2015).

Considerando il ruolo chiave nella regolazione di queste importanti funzioni cellulari, il fattore di trascrizione Nrf2 è stato studiato nelle patologie in cui è riconosciuto un coinvolgimento dello stress ossidativo, come le malattie neurodegenerative. Studi condotti su modelli murini di SM hanno dimostrato che l'assenza della proteina, in topi knockout per NRF2, peggiora il fenotipo clinico (Johnson et al., 2010 (a)), mentre l'induzione, Nrf2-dipendente, dei geni antiossidanti reprime la produzione di IL-17 e di altri mediatori proinfiammatori esercitando così un effetto neuroprotettivo (Pareek et al., 2011). È stato osservato che l'utilizzo di induttori di Nrf2 nella dieta di topi modelli di HD porta a sovraregolazione dei geni ARE-dipendenti conducendo a riduzione dello stress ossidativo, miglioramento della disabilità motoria e aumento della longevità (Stack et al., 2010). Diversi studi effettuati su modelli murini di AD hanno dimostrato che l'attivazione del *pathway* Nrf2-ARE, mediata dall'utilizzo di induttori, migliora la disfunzione cognitiva (Kim et al., 2013), la conservazione della memoria spaziale (Dumont et al., 2009) e riduce i livelli di stress ossidativo (Eftekharzadeh et al., 2010). È stato provato che l'uso di induttori di Nrf2, in modelli murini di PD, fornisce protezione contro gli insulti ossidativi (Siebert et al., 2009; Lou et al., 2014). Vargas e collaboratori hanno sviluppato un ceppo di topi transgenici (GFAP-Nrf2) che sovraesprime il gene NRF2 inserendolo sotto il controllo del promotore del gene hGFAP, selettivamente espresso negli astrociti. I ricercatori hanno osservato un aumento dell'mRNA e della proteina Nrf2 negli astrociti, rispetto al topo non transgenico. Tale incremento induce l'elevata espressione di due geni ARE-dipendenti, controllati dal fattore di trascrizione Nrf2, GCLC e GCLM, codificanti rispettivamente per la subunità catalitica e regolatoria della γ -GCL. Il conseguente aumento della produzione di tale enzima, critico per la sintesi del glutatione, conduce a un incremento di 2 volte del glutatione totale (GSH + GSSG), sia di quello contenuto all'interno degli astrociti sia di quello rilasciato ai neuroni. È stato inoltre osservato che l'aumento dei livelli dell'antiossidante è associato ad una migliore risposta cellulare degli astrociti allo stress ossidativo, indotto tramite il trattamento con *tert*-butil idroperossido. I ricercatori hanno poi creato un modello murino bitransgenico (hSOD1G93A/GFAP-Nrf2) con mutazione nella SOD1 e sovraespressione di Nrf2. Gli autori hanno quindi paragonato la percentuale di sopravvivenza dei motoneuroni nei diversi ceppi

murini: topi di controllo, topi hSOD1G93A, topi hSOD1G93A/GFAP-Nrf2. Tale analisi ha mostrato una riduzione del 40% della sopravvivenza dei motoneuroni dei topi hSOD1G93A rispetto ai controlli, attribuita a meccanismi ancora sconosciuti di tossicità indotta dalla SOD1 mutata. La riduzione della sopravvivenza non è stata invece riscontrata nei motoneuroni dei topi bitransgenici. Vargas e collaboratori hanno quindi concluso che la sovraespressione di Nrf2 nelle cellule gliali aumenta direttamente la resistenza allo stress ossidativo negli astrociti e migliora indirettamente, attraverso aumentata secrezione di glutazione, la capacità dei motoneuroni di neutralizzare gli effetti tossici provocati dalla SOD1 mutata (Vargas et al., 2008).

In un altro studio è stata condotta l'analisi dell'espressione di Nrf2 e di Keap1 in campioni autoptici di corteccia motoria primaria e di midollo spinale di pazienti SLA. I risultati hanno mostrato una riduzione dell'mRNA di Nrf2 e della proteina all'interno dei neuroni dei pazienti rispetto ai controlli, mentre non sono state rilevate variazioni nei livelli dell'mRNA di Keap1 e della proteina stessa (Sarlette et al, 2008). Inoltre, è stata osservata colocalizzazione di Keap1 all'interno delle inclusioni intracellulari presenti nei motoneuroni di pazienti con SLA (Tanji et al., 2013).

Il gene *NRF2* (o *NFE2L2*) (gene ID: 4780) mappa sul cromosoma 2q31.2 ed è costituito da cinque esoni e quattro introni (Marzec et al., 2007). È considerato un gene evolutivamente conservato data l'elevata omologia di sequenza riscontrata in molte specie. *NRF2* è altamente polimorfico presentando una frequenza mutagenica di 1 base ogni 72 bp; sono state riscontrate numerose varianti geniche in diversi gruppi etnici nella regione codificante del gene, negli introni e nella regione del promotore (Cho et al., 2013). Vari studi hanno valutato la possibile relazione di tali varianti polimorfiche con patologie legate allo stress ossidativo, data la funzione di Nrf2 nell'indurre la risposta antiossidante cellulare. Per quanto riguarda la regione codificante del gene, un'unica variante nell'esone 1 è stata associata al rischio di sviluppare la broncopneumopatia cronica ostruttiva (COPD) (Hua et al., 2010). Particolare attenzione è stata rivolta agli SNPs presenti negli introni e nella regione del promotore dato che potrebbero essere coinvolti, rispettivamente, nell'alterazione dello *splicing* dell'mRNA e nella regolazione trascrizionale del gene (Cho et al., 2013). In particolare, sono stati studiati tre polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs), presenti nel promotore del gene; tali SNPs consistono in un cambiamento di base citosina → adenina (C>A), guanina → adenina (G>A) e adenina → guanina (A>G) rispettivamente in posizione -617 (rs6721961), -651 (rs6706649) e -653 (rs35652124) dal sito di inizio della trascrizione (Marzec et al., 2007). Il browser *Ensembl* fornisce le frequenze degli alleli minori (MAF) dei tre SNPs -653A>G, -651C>A e -617C>A, stimate rispettivamente 0.38, 0.06 e 0.15 e riporta i dati di *linkage disequilibrium* (LD) relativo agli SNPs utilizzando le informazioni del progetto "1000 Genomi". Come misura del LD viene indicato, oltre al valore di

r^2 , cioè il coefficiente di correlazione tra una coppia di loci, anche quello del D' , che valuta la differenza tra la frequenza osservata ed attesa di un determinato aplotipo. I dati evidenziano un forte LD tra lo SNPs -653A>G e -651C>A ($D'=1.000/ r^2=0.056$) e tra il -653A>G e il -617C>A ($D'=0.999/ r^2=0.056$) nella popolazione Toscana; il nostro campione di studio presenta la stessa provenienza geografica.

Marzec e collaboratori hanno dimostrato la localizzazione di tali polimorfismi utilizzando l'*Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA). Lo SNP -617 C>A è situato a livello dell'elemento *ARE-like*, sito di legame per Nrf2, deputato all'autoregolazione del gene *NRF2* stesso; gli SNPs -651 G>A e -653 A>G sono localizzati nella regione *stress-response element* (StRE) dove si lega il fattore di trascrizione *myeloid zinc finger-1* (Mzf1) (Marzec et al., 2007). Mediante *Transcription Factor Motif Analysis* (TRASFAC) è stato osservato che i cambiamenti nucleotidici sono in grado di modificare la stabilità del legame dei fattori di trascrizione alle rispettive sequenze bersaglio; infatti, variazioni nei siti -653/-651 e -617 potrebbero alterare la sequenza consenso di riconoscimento per Mzf1 e per Nrf2 rispettivamente e influenzare la trascrizione di *NRF2*. Per determinare se la presenza delle varianti polimorfiche fosse in grado di influenzare l'espressione del gene, gli autori hanno utilizzato il gene reporter della luciferasi, trasfettato in cellule epiteliali polmonari. Hanno osservato un'espressione del gene 4 volte superiore quando la sua trascrizione è sotto il controllo del promotore *wild-type* di *NRF2* rispetto ad un costrutto con il promotore delecto dei tre SNPs. Inoltre, l'attività basale della luciferasi risultava superiore con il promotore *wild type* rispetto all'espressione ottenuta con 3 diversi promotori, ognuno recante una singola variante polimorfica (-653G, -651A o -617A) (Marzec et al., 2007). Uno studio simile è stato condotto da Marczak e collaboratori (2012) su cellule endoteliali ottenendo risultati analoghi. Gli autori hanno anche osservato, stimolando le cellule con diverse sostanze come ad esempio il H_2O_2 , un aumento di attività, rispetto alle condizioni basali, sia nel caso in cui il promotore è di tipo *wild-type*, sia quando presenta una delle tre varianti polimorfiche. L'espressione genica risultava, inoltre, generalmente attenuata nei costrutti portatori di una delle tre varianti rispetto al costrutto *wild-type*, sia in condizioni basali che, in misura maggiore, di stress indotto (Figura 9) (Marczak et al., 2012).

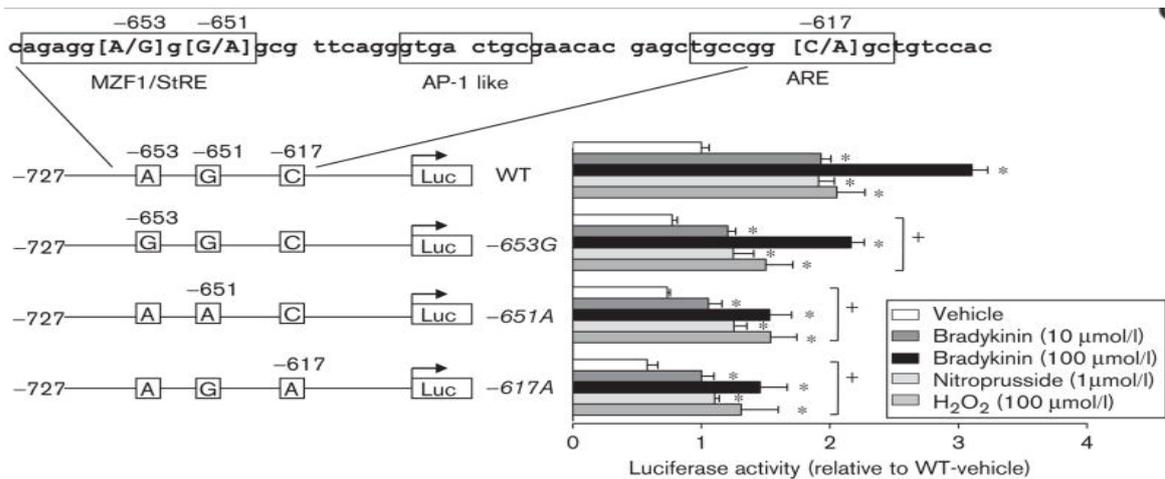


Fig. 9: Localizzazione degli SNPs -653A>G, -651G>A e -617C>A nel promotore del gene *NRF2*; attività della luciferasi con i diversi costrutti del promotore di *NRF2*, sia in condizioni basali (vehicle) che di stress indotto con varie sostanze (Marczak et al., 2012).

Secondo gli autori le varianti polimorfiche influenzano la trascrizione di *NRF2* portando a minor produzione della proteina con conseguente attenuazione della trascrizione dei suoi geni bersaglio ARE-dipendenti (Marzec et al., 2007; Marczak et al., 2012).

Tali dati contrastano con quelli riportati dal portale *Genotype-Tissue Expression* (GTEx, <http://www.gtexportal.org>, Broad Institute), un database nato per valutare come le varianti genomiche possano modificare l'attività dei geni. A tale scopo il Consorzio GTEx si è proposto di associare all'analisi *genome-wide association studies* (GWAS) il sequenziamento dell'RNA di più di 50 tessuti post-mortem di oltre 400 donatori. I dati riportati da GTEx non mostrano variazioni significative nell'espressione del gene *NRF2* valutata nei vari tessuti, in funzione degli SNPs -653A>G, -651G>A e -617C>A (GTEx Consortium, 2015).

Sulla base di quanto dimostrato rispettivamente dai gruppi di Marzec e di Marczak, diversi studi hanno valutato il ruolo dei tre polimorfismi, presenti nel promotore di *NRF2*, in alcune malattie per le quali è stato ipotizzato un ruolo patogenetico dello stress ossidativo. Queste varianti sono risultate associate all'insorgenza o al fenotipo clinico di patologie polmonari (Marzec et al., 2007; Shaheen et al., 2010; Hua et al., 2010; Masuko et al., 2011), malattie cardiovascolari (Bouligand et al., 2011; Marczak et al., 2012; Shimoyama et al., 2014), carcinoma mammario (Hartikainen et al., 2012), malattie gastrointestinali (Arisawa et al., 2007; Arisawa et al., 2008 b) e malattie neurodegenerative (Von Otter et al., 2010; Von Otter et al., 2014; Bergstrom et al., 2014). In particolare, studi condotti su pazienti con PD hanno riscontrato un effetto protettivo dell'aplotipo GAGCAAAA, dovuto, secondo gli autori, alla presenza contemporanea degli alleli comuni in corrispondenza dei tre polimorfismi funzionali del promotore (AGC): tale aplotipo è risultato associato ad un minor rischio di sviluppare il PD sia in una popolazione polacca che in una svedese e, in quest'ultima sembra anche ritardare l'età di insorgenza della malattia di 4,6

anni (Von Otter et al., 2010). Successivamente, gli stessi ricercatori in uno studio di meta-analisi, esteso a pazienti italiani, maltesi e tedeschi, hanno confermato gli effetti protettivi dell'aplotipo GAGCAAAA e individuato quattro singoli SNPs associati con l'età di insorgenza della malattia; specificatamente, la variante allelica -653G anticipa l'esordio del PD di 1.1 anni per allele (Von Otter et al., 2014).

Infine, Bergstrom e collaboratori (2014), in una coorte di pazienti svedesi con SLAs, hanno dimostrato che l'aplotipo GAGCAGA è associato con un ritardo di 4 anni dell'età di insorgenza della malattia, confermando l'importante ruolo di Nrf2 anche in questa patologia.

2. SCOPO

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare una possibile associazione tra i polimorfismi -653 A>G, -651 G>A e -617 C>A, presenti nel promotore del gene *NRF2*, e il rischio di insorgenza di SLA e la loro possibile implicazione nei meccanismi molecolari che sono alla base della risposta cellulare allo stress ossidativo.

Al fine di valutare una possibile associazione dei tre polimorfismi sia con l'insorgenza che con le caratteristiche cliniche della patologia sono stati genotipizzati, tramite sequenziamento diretto, 140 pazienti SLA e 134 controlli sani.

Allo scopo di verificare un'eventuale alterazione dell'equilibrio redox nella popolazione dei pazienti rispetto a quella dei controlli sono stati analizzati, tramite metodi spettrofotometrici, i livelli plasmatici di alcuni biomarcatori di stress ossidativo. In particolare, come marker di danno ossidativo, sono stati valutati i Prodotti di Ossidazione Avanzata alle Proteine (AOPP), e come markers antiossidanti non enzimatici, sono stati dosati la Capacità Antiossidante Ferro Riducente (FRAP) e i gruppi tiolici totali plasmatici. Inoltre, come markers antiossidanti enzimatici, sono stati valutati, in 28 pazienti sSLA e in 10 controlli sani, l'attività totale dell'enzima Superossido Dismutasi (Sod) e della Catalasi (Cat).

Considerando la funzione del fattore di trascrizione Nrf2 come "sensore" del danno indotto dallo stress ossidativo e la sua capacità di regolare l'espressione di molti geni antiossidanti e di fattori essenziali per la sopravvivenza neuronale, è stata verificata una eventuale implicazione dei tre polimorfismi nella risposta cellulare all'insulto ossidativo: la possibile influenza delle varianti alleliche rare sui livelli plasmatici dei marcatori di stress ossidativo è stata valutata, sia nella popolazione totale che nelle popolazioni di pazienti e controlli separatamente, suddividendo i soggetti in base al genotipo per ogni polimorfismo oggetto di studio.

3. PAZIENTI E METODI

3.1 POPOLAZIONE DI STUDIO

I pazienti ed i controlli, presi in esame in questo lavoro appartengono tutti al gruppo etnico caucasico di origine italiana. La popolazione dei pazienti è stata reclutata presso il Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, U.O. Neurologia-Neurofisiopatologia dell'Università di Pisa ed è costituita da 142 soggetti con SLAs. La diagnosi è stata condotta seguendo i criteri elettrofisiologici dettati dalla Federazione Mondiale di Neurologia di El Escorial. Nessuno dei nostri pazienti mostrava co-morbidità e familiarità. Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti SLAs sono mostrate nella tabella 3. In particolare, oltre a valutare età di esordio e durata media di malattia, considerata come intervallo di tempo che intercorre tra la diagnosi e il decesso o la ventilazione assistita del paziente, abbiamo suddiviso i pazienti in bulbari e spinali, considerando il sito anatomico di esordio. Inoltre ad ogni paziente è stato attribuito un punteggio dell'*ALS Functional Rating Scale* (ALSFRS). L'ALSFRS permette di stimare la funzionalità globale del paziente e il suo grado di autosufficienza, tramite la valutazione di alcuni parametri che vengono ricavati ponendo domande specifiche al paziente o ai familiari o tutori. Tre domande indagano l'eventuale coinvolgimento bulbare (linguaggio, salivazione, deglutizione); altre sei domande indagano il livello di autosufficienza correlato alla funzione motoria a vari livelli (scrivere a mano, tagliare il cibo e usare utensili, vestirsi e lavarsi, girarsi nel letto e aggiustare le coperte, camminare, salire le scale); infine tre domande valutano la funzione respiratoria, l'ortopnea e la necessità di assistenza ventilatoria. Viene assegnato un punteggio da 0 a 48 in modo direttamente proporzionale allo stato di salute del paziente (Maier et al., 2012).

Tabella3 Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti SLA e dei controlli

Caratteristiche	Pazienti SLA N° totale= 140	Controlli N° totale= 134	p-value
Genere: F(%) / M(%)	53(37.8) / 87(62.1)	66(49.3) / 68(50.7)	0,0571
Età (anni): media ± DS	63,97 ± 10,57	64,67 ± 13,69	0,7890
Età di esordio (anni): media ± DS	59.61± 11.40	-	-
Durata malattia (mesi): media ± DS	81.38 ± 43.06	-	-
ALSFRS	39 ± 8.15	-	-
Bulbari (N°)	22	-	-
Spinali (N°)	78	-	-

Il campione dei controlli è composto da 134 soggetti sani, appaiati per età e genere che non presentano alcun legame di parentela con i pazienti. Inoltre ciascun individuo sano è stato sottoposto ad un'attenta anamnesi al fine di escludere la presenza di malattie neurodegenerative non conclamate.

Ciascun membro delle due popolazioni in studio ha sottoscritto il consenso informato per l'analisi del genotipo. Inoltre, lo studio è stato eseguito in conformità alla Dichiarazione di Helsinki e con l'approvazione del Comitato Etico Locale, con sede presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Pisa.

3.2 DISEGNO DELLO STUDIO

Questo lavoro di tesi è stato articolato in due fasi sperimentali. Nella prima sono stati tipizzati 140 pazienti SLAs e 134 controlli sani per i polimorfismi -653A > G, -651G > A e -617 C > A presenti nella regione del promotore del gene *NRF2*. Nella seconda fase sperimentale, sono stati valutati i livelli plasmatici di alcuni biomarcatori periferici di stress ossidativo; in particolare sono stati analizzati, nell'intera popolazione di studio (pazienti e controlli), tramite metodiche spettrofotometriche, i Prodotti di Ossidazione Avanzata alle Proteine (AOPP), come marker di danno ossidativo, la Capacità Antiossidante Ferro Riducente (FRAP) e i gruppi tiolici totali plasmatici (-SH), come markers antiossidanti non enzimatici. Inoltre, in un sottogruppo di 28 pazienti SLAs e 10 controlli sani, sono state valutate l'attività totale dell'enzima Superossido Dismutasi (SOD) e dell'enzima Catalasi (CAT), quali biomarcatori antiossidanti enzimatici.

3.3 METODICHE DI LABORATORIO

3.3.1 GENOTIPIZZAZIONE DEI POLIMORFISMI NEL PROMOTORE DEL GENE *NRF2*

Gli SNP sono stati analizzati, utilizzando DNA genomico estratto da linfociti di sangue periferico, tramite sequenziamento automatico. Il protocollo di genotipizzazione per l'analisi degli SNPs è stato adattato da Von Otter e collaboratori (Von Otter et al., 2010) e i polimorfismi sono stati analizzati utilizzando un sequenziatore automatico ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Life Technologies).

3.3.1.1 Estrazione di DNA genomico da sangue intero

Il DNA genomico è stato estratto da linfociti di sangue periferico, raccolto in provette contenenti l'anticoagulante potassio - acido etilendiamminotetraacetico (K⁺-EDTA), tramite l'uso del kit commerciale QIAamp DNA blood MINI kit (Qiagen), in accordo con i protocolli standard (Sambrook e Russel, 2001). Per eseguire l'estrazione, in una *ependorf* da 1.5 ml, a 200 µl di sangue intero a temperatura ambiente sono stati aggiunti 20 µl di proteinasi-K che, degradando la

componente proteica, permette la lisi delle cellule e 200 µl di *Lysis Buffer* (BUFFER AL), che permetterà, successivamente, il legame selettivo degli acidi nucleici al filtro in dotazione nel kit. Dopo che il campione è stato incubato a 56°C per 10 minuti, sono stati aggiunti 200 µl di etanolo assoluto (96-100%) per permettere la precipitazione del DNA e la miscela così ottenuta viene trasferita in una *QIAamp Mini spin column*, inserita in una *ependorf*, e centrifugata per 1 minuto a 8000 rpm a temperatura ambiente. Questo passaggio permette al DNA di rimanere intrappolato nella membrana di silice della colonna e al materiale di scarto di precipitare sul fondo della *ependorf*. Si procede, quindi, con una serie di lavaggi utilizzando due diversi tamponi. Prima sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW1 (*Inhibitor Removal Buffer*), che permette di denaturare le proteine nel campione, e la miscela è stata centrifugata ad 8000 rpm. Per il secondo lavaggio sono stati aggiunti 500 µl di buffer AW2 (*Washing Buffer*), contenente etanolo, necessario per rimuovere i sali dalla colonna e purificare il DNA. Il campione è stato centrifugato prima a 12000 rpm per 3 minuti e, dopo rimozione del precipitato, a 12000 rpm per 1 minuto, in modo da rimuovere la parte spuria. In fine il campione è stato eluito, in una nuova *ependorf*, aggiungendo 200 µl dell'apposito tampone di eluizione *Elution Buffer* (AE) e centrifugato ad 8000 rpm per 1 minuto in modo da trattenere nel filtro la parte spuria e raccogliere sul fondo della *ependorf* DNA purificato e diluito (100ng/ µl circa), pronto per essere utilizzato per metodiche come la reazione a catena della polimerasi (PCR).

3.3.1.2 Reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

La PCR è una tecnica di biologia molecolare ideata nel 1983 da Kary B. Mullis, motivo per cui ottenne il premio Nobel per la chimica (1993). Questa tecnica permette di riprodurre, *in vitro*, un passaggio fondamentale della duplicazione del DNA; infatti, conoscendo le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali della sequenza bersaglio, possiamo costruire oligonucleotidi sintetici (15-20 nucleotidi), chiamati *primers*, complementari a tali zone, ed utilizzarli in una miscela di reazione contenente i reagenti per permettere l'amplificazione della sequenza target. In una prima fase la miscela viene riscaldata ad una temperatura tale da permettere la separazione della doppia elica di DNA (fase di denaturazione), poi la temperatura viene abbassata per consentire ai *primers* di ibridare, con legami deboli, alle due estremità 3' della sequenza da amplificare (fase di riassociazione) permettendo così l'attacco di un enzima, una DNA polimerasi termostabile. La Taq polimerasi, isolata dal batterio *Thermus aquaticus*, utilizzando come substrato i deossinucleosidi-trifosfato, permette la sintesi di un neofilamento complementare a quello stampo (fase di elongazione). Completato il primo ciclo di PCR si ottengono due molecole di DNA a doppio filamento e ad ogni ciclo successivo le copie di DNA presenti nella miscela di reazione raddoppiano, per cui il processo assume un andamento

esponenziale. Ne risulta la produzione di un numero elevatissimo di molecole di DNA in un tempo relativamente breve (alcune ore).

La mix di reazione, con un volume finale di 25 μ l, su cui è stata eseguita la PCR, era così composta: 4.75 μ l di acqua RNAsi-DNAsi Free; 2.5 μ l di Buffer 10X; 2.5 μ l di dNTPs; 2 μ l di GC-Rich 5X; 0.25 μ l di Fast Start Taq (2.5 U); 5 μ l di DNA genomico e 4 μ l di ciascun primer [1 μ M]:

- forward 5' - TGA CCA CTC TCC GAC CCT AAA - 3'
- reverse 5' - GGA GTT CGG ACG CTT TGA AA - 3'

La regione del genoma nucleare di interesse (frammento di 392 paia basi) è stata amplificata tramite un termociclatore (*Applied Biosystem*), mediante l'utilizzo del seguente programma di amplificazione:

- un ciclo di denaturazione a 94°C per 5 minuti;
- 35 cicli di amplificazione costituiti da:
 - fase di denaturazione a 94°C per 1 minuto,
 - fase di ibridazione (*annealing*) dei *primers* a 59°C per 1 minuto,
 - fase di estensione (*elongation*) dei *primers* a 72°C per 30 secondi,
- un ciclo di estensione finale a 72°C per 7 minuti;
- ∞ 4°C

3.3.1.3 Elettroforesi su gel d'agarosio

Il prodotto di PCR è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in buffer TAE (Tris-Acetato e EDTA [0.5 M], pH 8.0) in modo da verificare che la regione di interesse fosse stata amplificata correttamente. Il principio su cui si basa l'elettroforesi è il seguente: in presenza di un campo elettrico applicato al tampone in cui è immerso il gel, il DNA, carico negativamente, tende a migrare verso il polo positivo spostandosi lungo le maglie del gel; la velocità di migrazione è inversamente proporzionale al peso molecolare del DNA e alla concentrazione del gel. La soluzione, di agarosio e TAE, è stata riscaldata fino all'ebollizione e posta sotto cappa chimica, dove è stato aggiunto l'Etidio Bromuro (pari ad 1/20 del volume finale della soluzione), un colorante fluorescente, contenente un gruppo planare che si intercala tra le coppie di basi del DNA. La soluzione è stata quindi versata nel gel-caster, in cui viene inserito un pettinino che crea i pozzetti di caricamento e lasciata solidificare sotto cappa. La soluzione polimerizza ed il gel ottenuto, dopo rimozione del pettinino, viene posizionato nella cameretta elettroforetica riempita con tampone TAE. Nei rispettivi pozzetti sono stati caricati 5 μ l di ciascun campione,

ognuno diluito con 3 μ l di PCR *Loading Buffer*, contenente glicerolo, che aumentando la densità del campione permette la sua precipitazione sul fondo del pozzetto evitando la sua fuoriuscita, blu di bromofenolo, che mescolato al campione migra verso il polo positivo e permette di seguire l'andamento della corsa, l'SDS, un detergente anionico e l'EDTA che porta la soluzione al giusto pH. In un pozzetto sono anche caricati 5 μ l di un marcatore contenente frammenti di DNA di dimensioni note. Il gel viene quindi sottoposto a corsa elettroforetica, ad un voltaggio costante di 150 Volt. Al termine della corsa i frammenti di DNA sono visualizzati utilizzando un transilluminatore UVITEC *Cambridge* che illumina il gel con luce ultravioletta (254nm); l'etidio bromuro emette fluorescenza (590nm) dando una colorazione giallo-arancione.

3.3.1.4 Purificazione del prodotto di PCR e analisi di sequenza

Dopo aver verificato l'avvenuta amplificazione, 5 μ l del prodotto di PCR sono stati purificati mediante l'aggiunta di 2 μ l ExoSAP (*GE Healthcare*). Il metodo si basa su una reazione enzimatica cui esonucleasi I e fosfatasi alcalina degradano rispettivamente *primers* e dNTPs in eccesso, non utilizzati durante l'amplificazione. La reazione è costituita da due fasi:

- reazione di degradazione: 30 minuti a 37°C;
- blocco della reazione: 15 minuti a 80°C

è stata quindi eseguita una PCR di sequenza, in cui viene impiegato un solo *primer*, cosicché l'amplificazione del prodotto risulti lineare e non esponenziale, e vengono utilizzati oltre ai dNTPs, anche dideossinucleotidi (ddNTPs), che hanno la particolarità di interrompere la reazione quando sono incorporati nel filamento. La mix è stata ottenuta aggiungendo a 1.5 μ l di campione precedentemente purificato, 1.9 μ l di acqua RNAsi-DNAsi Free, 4 μ l di Buffer 10X con EDTA, 1.6 μ l di primer forward [1 μ M] e 1 μ l di BigDye Terminator (*Life Technologies*) che contiene i quattro ddNTPs terminatori coniugati con un fluorocromo diverso per ciascuna base azotata. L'amplificazione è stata eseguita al termociclatore secondo il seguente protocollo:

- un ciclo di denaturazione a 96°C per 1 minuto;
- 25 cicli di amplificazione, ciascuno dei quali costituito da:
 - fase di denaturazione a 96°C per 10 secondi;
 - fase di annealing del primer a 50°C per 5 secondi;
 - fase di estensione a 60°C per 4 minuti;
- 4°C ∞ .

In questo modo si ottengono un insieme di frammenti, marcati solo su una delle due eliche. Il prodotto della reazione di sequenza, è stato purificato mediante filtrazione con l'utilizzo di colonnine preidratate (Qiagen); in uno primo step, le colonnine vengono centrifugate a 3000 rpm per 3 minuti al fine di disidratare la resina contenuta all'interno, poi è stato aggiunto il prodotto

di PCR di sequenza, sulla superficie della resina (facendo attenzione a non toccare la resina con il puntale); successivamente i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 3 minuti ed all'eluato ottenuto è stato aggiunto un uguale volume di Formammide (*Life Technologies*). I campioni sono stati incubati a 94°C per 2 minuti, per ottenere la separazione dei due filamenti di DNA e quindi sono stati caricati nel sequenziatore automatico ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (*Life Technologies*) che ha fornito la sequenza completa della regione del genoma nucleare di interesse (frammento di 392 paia basi). La sequenza ottenuta per ciascun campione è stata confrontata con la sequenza di riferimento, presente in banche dati, mediante “*software open source BLAST*”. Di seguito sono riportati alcuni esempi degli elettroferogrammi ottenuti: in figura 10 è mostrata una sequenza che presenta in tutti e tre i siti polimorfici gli alleli comuni in omozigosi (AA in posizione -653, GG in posizione -651, CC in posizione -617), in figura 11 è rappresentata una sequenza con SNPs in eterozigosi (A>G in posizione -653, G>A in posizione -651, C>A in posizione -617); infine, nella figura 12 è riportato l'elettroferogramma della sequenza con lo SNP -653A>G in omozigosi per l'allele raro.

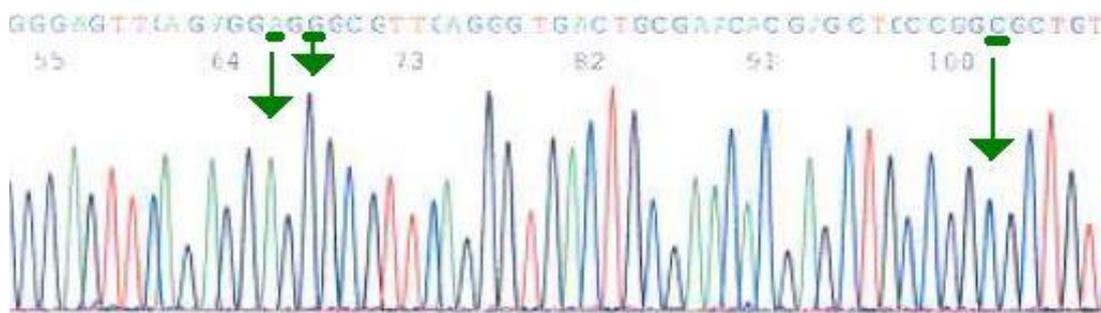


Fig. 10: Elettroferogramma della regione di interesse del promotore del gene *NRF2*. Assenza di SNPs.



Fig. 11: Elettroferogramma della regione di interesse del promotore del gene *NRF2*. SNPs in eterozigosi.

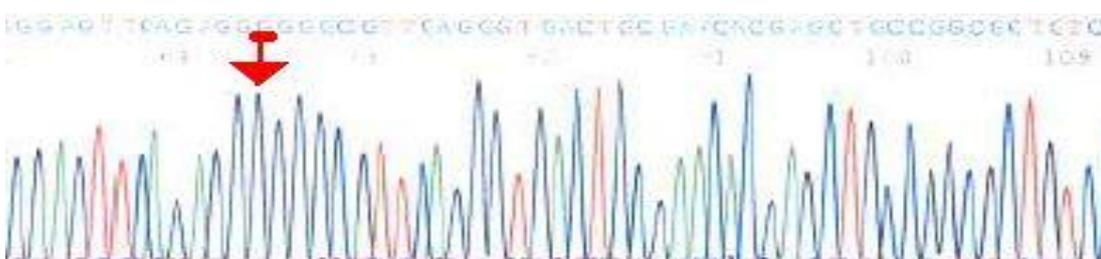


Fig. 12: Elettroferogramma della regione di interesse del promotore del gene *NRF2*. Presenza della mutazione in omozigosi A>G in posizione -653.

3.3.2 BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO

Il sangue prelevato è stato raccolto rispettivamente in una provetta contenente K^+ -EDTA, per il dosaggio degli AOPP e dei tioli, e in una provetta con l'anticoagulante litio-eparina, per il dosaggio della FRAP, dell'attività della SOD e della catalasi. I campioni sono stati prontamente centrifugati per 10 minuti a 1000 x g ad una temperatura di 4°C ed il plasma così ottenuto è stato congelato a -80°C fino al momento del dosaggio.

3.3.2.1 Determinazione dei prodotti di ossidazione avanza alle proteine (AOPP)

La determinazione degli AOPP è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Witko-Sarsat e collaboratori (1996) e permette di stimare la quantità di proteine che hanno subito un processo di ossidazione, a livello di specifici residui amminoacidici, da parte di specie chimiche reattive.

Il dosaggio delle AOPP è stato preceduto dalla preparazione delle soluzioni necessarie per effettuare l'analisi:

1. Tampone fosfato di Dulbecco (PBS): sono stati sciolti 4.77g di PBS in 500 ml di acqua distillata mediante l'uso di un agitatore magnetico.
2. Ioduro di potassio (KI): è stato preparato sciogliendo 1.925g di polvere in 10 ml di acqua distillata.
3. Standard Cloramina T: sono stati sciolti 2.27g di cloramina T per litro di PBS al fine di ottenere una soluzione "stock" [10Mm] (100X), da cui sono stati preparati, mediante diluizioni scalari, gli standard a diverse concentrazioni: sono stati diluiti 100 µl di stock in 900 µl di PBS per ottenere una soluzione Cloramina T 1mM (10X), poi 140 µl di soluzione 10X sono stati diluiti in 1200 µl di PBS per avere Cloramina T [0.1 mM] (1X); da quest'ultima soluzione, tramite diluizioni scalari, diluendo ogni volta 700 µl della soluzione precedente in 700 µl di PBS, sono stati ottenuti gli standards a diverse concentrazioni: 0,05 mM (1:2), 0,025 mM (1:4), 0,0125 mM (1:8), 0,00625 mM (1:16), 0,003125 mM (1:32), 0,0015625 mM (1:64). Lo standard 0 mM ("bianco") era costituito da 700 µl di PBS.

È stata quindi eseguita la semina su piastra da 96 pozzetti (Costar), trasparenti agli UV (Greiner bio-one), in cui sono stati caricati, in doppio, nell'ordine 200 µl di bianco, 200 µl di ciascuno standard, 30 µl dei campioni di plasma da analizzare diluiti con 170 µl di PBS. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 20 µl di acido acetico glaciale (CH_3COOH) e 10 µl di KI. Dopo un'incubazione per 1 minuto, a temperatura ambiente, è stato letto il valore di assorbanza dei campioni ad una lunghezza d'onda di 340 nm, mediante l'ausilio di un lettore di piastra (Tecan SPECTRA). Il valore di assorbanza del campione deve essere compreso tra il valore di

assorbanza del bianco e il valore di assorbanza dello standard 0.05mM, se il valore non rientra nel *range*, non può essere considerato accettabile. È stata poi allestita una curva di calibrazione utilizzando i valori medi di assorbanza degli standard a diverse concentrazioni. La concentrazione di ciascun campione di plasma analizzato è stata calcolata utilizzando l'equazione ottenuta dalla retta di regressione lineare; il valore degli AOPP è stato espresso in nmol/ml di equivalenti di cloramina T.

3.3.2.2 Determinazione della capacità ferro-riducente del plasma (FRAP)

La determinazione della FRAP è una metodica che consente di valutare la capacità antiossidante del plasma mediante la riduzione, da parte del plasma stesso, dello ione ferrico, presente nel reattivo FRAP, in ione ferroso. Tale dosaggio biochimico è stato eseguito secondo il protocollo messo a punto da Benzie e Strain (1996).

Nel primo step sono state preparate le soluzioni necessarie all'analisi:

1. Soluzione di CH₃COOH: sono stati diluiti 1.76 ml di CH₃COOH glaciale (300 mM) in 100 ml di acqua distillata.
2. Soluzione di acetato di sodio (CH₃COONa): sono stati sciolti 0.817g di CH₃COONa in 20 ml di acqua distillata, mediante l'ausilio di un agitatore.
3. Tampone sodio acetato (pH 3.6): è stato preparato aggiungendo la soluzione di CH₃COONa alla soluzione di CH₃COOH fino a raggiungere un pH di 3.6.
4. Acido cloridrico (HCl): sono state effettuate delle diluizioni scalari partendo da una soluzione stock con concentrazione 12 M:
 - HCl [1 M]: ad 1 ml di stock 12 M sono stati aggiunti 11 ml di acqua distillata;
 - HCl [0.04 M]: ad 1 ml di HCl 1 M sono stati aggiunti 24 ml di acqua distillata;
 - HCl [0.01 M]: a 5 ml di HCl 0.04 M sono stati aggiunti 15 ml di acqua distillata.
5. Standard di Solfato di ferro eptaidrato (FeSO₄•7H₂O) [4 mM]: sono stati sciolti 11.1 mg di FeSO₄•7H₂O in 10 ml di HCl [0.01 M] per ottenere la soluzione "stock" [4 mM]. Partendo da quest'ultima soluzione sono stati preparati mediante diluizioni scalari, diluendo ogni volta 100 µl della soluzione precedente in 100 µl di HCl, gli standard a diverse concentrazioni: 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mM. Lo standard 0 mM ("bianco") era, costituito da 100 µl di HCl.
6. Tripiridiltriazina (TPTZ) [10 mM]: è stata preparata sciogliendo 15.62 mg di polvere di TPTZ in 5 ml di HCl [0.04 M].
7. Cloruro ferrico (FeCl₃) [20 mM]: 27 mg di FeCl₃ sono stati sciolti in 5 ml di acqua distillata.

8. Reattivo FRAP: è stato preparato miscelando

- 10 volumi di tampone sodio acetato (pH 3.6) [300 mM];
- 1 volume di TPTZ;
- 1 volume di FeCl₃.

Il reattivo così preparato è stato incubato a 37°C per 10 minuti.

La semina su piastra di 96 pozzetti (Costar) è stata effettuata, in doppio, caricando 8 µl di bianco, 8 µl di ciascuno standard e 8 µl di plasma di ogni campione; a questi sono stati aggiunti 250 µl di reattivo FRAP e dopo un'incubazione di 4 minuti sono stati letti i valori di assorbanza, ad una lunghezza d'onda di 620 nm, con un lettore di piastra (Tecan Spectra Classic). Il valore di assorbanza del campione deve essere compreso tra il valore minimo e il valore massimo della curva standard. È stata allestita una curva di calibrazione utilizzando i valori di assorbanza delle diluizioni scalari di FeSO₄•7H₂O. Dalla media dei valori di assorbanza di ciascun campione è stato sottratto il valore di assorbanza del bianco, la FRAP dei campioni analizzati è stata calcolata utilizzando l'equazione ottenuta della regressione lineare della curva standard. I dati sono stati espressi in mmol/l.

3.3.2.3 Determinazione dei tioli plasmatici (-SH)

Il dosaggio dei gruppi -SH è stato effettuato seguendo il protocollo descritto da Hu (1994) e successivamente modificato nel nostro laboratorio. Nella prima fase sono state preparate le soluzioni necessarie al dosaggio:

1. EDTA [50 M]: sono stati sciolti 37.22g in 200 ml di acqua distillata.
2. EDTA [20 mM]: sono stati diluiti 200 µl di EDTA 50 M con acqua distillata fino a raggiungere un volume finale di 500 ml.
3. TRIS [25 mM]: sono stati sciolti 1.5g di Trizma Base in 500 ml di acqua.
4. Tris Base [25 mM] – EDTA [20 mM] pH 8.2: la soluzione di EDTA 20 mM è stata portata ad un pH di 8.2 mediante aggiunta di Tris 25 mM.
5. 5-5-5'-di-tio-bis(2nitrobenzoico) (DTNB): sono stati sciolti 0.008g di DTNB in polvere in 2 ml di metanolo.

Successivamente sono state preparati i campioni prelevando 50 µl di plasma di ciascun paziente ai quali sono stati aggiunti nell'ordine:

- 150 µl di TRIS [25 mM] – EDTA [20 mM];
- 800 µl di metanolo;
- 10 µl di DTNB.

I campioni sono stati vortexati e poi, trascorsi 20 minuti di incubazione, a temperatura ambiente, sono stati centrifugati per 10 minuti a 5315 rpm, sempre a temperatura ambiente; da ciascun campione sono stati prelevati 250 µl di supernatante, che sono stati seminati in doppio, su piastra. L'assorbanza di ciascun campione e del bianco, costituito solo da DTNB, è stata misurata ad una lunghezza d'onda di 412 nm mediante l'uso di un lettore di piastra (Tecan Spectra Classic). Ai valori medi di assorbanza dei campioni sono stati sottratti i valori di assorbanza del bianco; i dati sono stati espressi in µmol/l.

3.3.2.4 Determinazione dell'attività delle Superossido dismutasi (SOD)

La determinazione della superossido dismutasi (SOD) è stata effettuata mediante kit commerciale (Cayman). Il kit prevede l'utilizzo di un sale di tetrazolium per la determinazione dei radicali superossido generati dalla xantina ossidasi e dalla ipoxantina e consente di valutare tutti e tre i tipi di SOD (Cu/Zn-, Mn- e Fe-SOD).

Inizialmente sono state preparate le soluzioni necessarie ad effettuare l'analisi:

1. Assay Buffer (10X): sono stati diluiti 3 ml di Assay Buffer concentrato con 27 ml di acqua distillata in modo da ottenere una soluzione diluita (50 mM Tris-HCl, pH 8.0).
2. Sample Buffer (10X): sono stati diluiti 2 ml di Sample Buffer concentrato con 18 ml di acqua distillata; la soluzione finale diluita ha una concentrazione di 50 mM Tris-HCl, pH 8.0.
3. Radical detector: 50 µl di soluzione sono stati diluiti con 19.95 ml di Assay Buffer diluito.
4. Xantina Ossidasi: sono stati diluiti 50 µl di enzima in 1.95 ml di Sample buffer diluito.
5. SOD standards: 20 µl di standard (fornito dal Kit) sono stati diluiti con 1.98 ml di Sample Buffer diluito ed è stata così ottenuta la soluzione "stock" dalla quale sono stati ricavati gli standards a diverse concentrazioni: 0.25, 0.2, 0.15, 0.1, 0.05, 0.025, 0 U/ml. Lo standard 0 U/ml ("bianco") era costituito da Sample Buffer diluito.

Successivamente i campioni di plasma sono stati diluiti con 1:5 con Sample Buffer e vortexati; quindi, sono stati seminati, in doppio, 10 µl di ciascun standard e di ogni campione, su una piastra da 96 pozzetti, fornita dal kit. A ciascun pozzetto sono stati aggiunti nell'ordine 200 µl di radical detector diluito e 20 µl di xantina ossidasi. La piastra è stata poi incubata a temperatura ambiente, su un agitatore, per 20 minuti. L'assorbanza dei campioni è stata letta ad una lunghezza d'onda di 450 nm tramite un lettore di piastra (Tecan Spectra Classic). Al fine di valutare l'attività della SOD, è stata allestita una curva di calibrazione utilizzando i valori di assorbanza degli standard; è stato calcolato il rapporto tra l'assorbanza del bianco e il valore di assorbanza di ciascun campione e standard. L'attività della SOD dei campioni di plasma

analizzati è stata calcolata utilizzando l'equazione ottenuta dalla retta di regressione lineare ed i dati sono stati espressi in U/ml; un'unità è definita come il totale di enzima necessario per dismutare il 50% del radicale superossido in O_2 e H_2O_2 .

3.3.2.5 Determinazione dell'attività della catalasi

La determinazione dell'attività della catalasi è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit commerciale (Cayman). Il metodo è basato sulla reazione dell'enzima con il metanolo in presenza di una concentrazione ottimale di H_2O_2 . Le aldeidi prodotte sono state determinate colorimetricamente con l'aggiunta di 4-amino-3-idrazino-5-mercapto-1,2,4-triazolo (Purpald) come cromogeno; questo forma un eterociclo con le aldeidi e, in seguito ai processi di ossidazione, porta ad un cambiamento di colore dal giallo al porpora.

Nel primo step sono stati preparati i reagenti da utilizzare nell'analisi:

1. Catalasi Assay Buffer (10X): sono stati diluiti 2 ml di Catalasi Assay Buffer concentrato con 18 ml di acqua distillata; si ottiene così un buffer diluito ([100 mM], pH 7.0).
2. Catalasi Sample Buffer (10X): 5 ml di Catalasi Sample Buffer concentrato sono stati diluiti con 45 ml di acqua distillata. Questo buffer diluito ([25 mM], pH 7.5)
3. Controllo positivo della catalasi: il liofilizzato fornito dal kit è stato ricostituito con 2 ml di Sample Buffer diluito e 100 μ l dell'enzima ricostituito sono stati ulteriormente diluiti con 1.9 ml di Sample Buffer diluito.
4. Idrossido di potassio (KOH): il pellet di KOH, posto in ghiaccio, è stato sciolto con 4 ml di acqua distillata e vortexato per ottenere una soluzione 10 M.
5. Perossido di idrogeno (H_2O_2): 40 μ l della soluzione fornita dal kit [8.82 M] sono stati diluiti con 9.96 ml di acqua distillata.
6. Catalasi Purpald (cromogeno): il reagente fornito, pronto per l'uso, contiene acido idrocloridrico [0.5 M].
7. Periodato di potassio: il reagente contiene potassio periodato in KOH [0.5 M].
8. Catalasi formaldeide standard: è costituito da formaldeide [4.25 M]; gli standard a diverse concentrazioni (0.25, 0.2, 0.15, 0.10, 0.05, 0.025, 0 nmol/min/ml) sono stati ottenuti partendo da una soluzione "stock" [4.25 mM] costituita da 10 μ l di Catalasi formaldeide diluita con 9.99 ml di Sample Buffer diluito.

Il secondo step ha previsto la semina, in doppio, su una piastra da 96 pozzetti fornita dal kit, di 20 μ l di tutti gli standard, 20 μ l di controllo positivo e 20 μ l di plasma di ciascun campione da analizzare. In ciascun pozzetto sono stati aggiunti prima 30 μ l di metanolo e 100 μ l di Assay Buffer diluito e poi 20 μ l di H_2O_2 diluito che dà il via alla reazione; la piastra è stata coperta e messa ad incubare per 20 minuti, a temperatura ambiente, su un agitatore. Trascorso questo

periodo di tempo sono sostati aggiunti, ad ogni pozzetto, 30 μ l di KOH diluito per far terminare la reazione e 30 μ l di cromogeno. La piastra è stata nuovamente coperta e dopo incubazione per 10 minuti, a temperatura ambiente, su un agitatore sono stati aggiunti 10 μ l di potassio periodato ad ogni pozzetto e la piastra è stata nuovamente incubata per altri 5 minuti prima di leggere i valori di assorbanza dei campioni ad una lunghezza d'onda di 550 nm. Il valore medio di assorbanza del bianco è stato sottratto rispettivamente all'assorbanza di standard e campioni di plasma. L'attività della catalasi dei campioni di plasma analizzati è stata calcolata utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare della curva standard. I dati sono stati espressi in nmol/min/ml. Quando il valore di assorbanza di un campione superava il valore di assorbanza dello standard più alto, i dosaggi venivano ripetuti diluendo il plasma 1:5 con Sample buffer diluito.

4. ANALISI STATISTICA

Per verificare che le frequenze alleliche e genotipiche nei gruppi oggetto di studio fossero in accordo con l'equilibrio di *Hardy-Weinberg* e per valutare le differenze nelle distribuzioni alleliche e genotipiche, abbiamo utilizzato il test del chi-quadro. L'*odds ratio* (OR) è stato calcolato mediante analisi di regressione logistica e fornito con intervallo di confidenza al 95%. L'associazione tra ciascun polimorfismo e ciascun dato clinico conosciuto dei pazienti, in particolare età di esordio, durata della malattia e punteggio di ALSFRS, è stata valutata tramite analisi della varianza (ANOVA) multifattoriale, correggendo per genere ed età anagrafica al campionamento, utilizzando il software STATGRAPHICS per Windows.

Per ciascun parametro biochimico, AOPP, FRAP, -SH, SOD e CAT è stato calcolato il valore medio e la deviazione standard ($media \pm DS$) per ogni soggetto appartenente alla popolazione in esame. L'ANOVA multifattoriale, con correzione per età e genere, è stato utilizzato anche per valutare le differenze nei livelli dei biomarcatori tra i gruppi di pazienti e controlli.

L'analisi di regressione lineare è stata effettuata sia per valutare la presenza di un'eventuale relazione tra i biomarcatori sia per studiare la correlazione tra ciascun biomarcatore e le caratteristiche cliniche della popolazione dei pazienti.

Infine, l'ANOVA a più fattori è stata utilizzata per correlare i dati biochimici con ciascun polimorfismo studiato, considerando età, genere e gli altri polimorfismi studiati come covariate.

Poiché i valori dei biomarcatori considerati non avevano una distribuzione normale, prima di effettuare l'analisi sono stati normalizzati trasformandoli in valori logaritmici. I livelli di significatività α utilizzati in questo lavoro sono 5%, 1% e 0.1%; ciascun test utilizzato è stato definito "statisticamente significativo" per $p < 0.05$.

5. RISULTATI

5.1. ANALISI DEI POLIMORFISMI NEL PROMOTORE DEL GENE *NRF2*

In questo studio 140 pazienti SLAs e 134 controlli sani sono stati tipizzati per i polimorfismi -653A>G, -651G>A e -617C>A presenti nella sequenza del promotore del gene *NRF2*; i risultati ottenuti sono illustrati nelle tabelle 4 e 5, in cui sono state riportate rispettivamente le frequenze alleliche e genotipiche, sia dei pazienti che dei controlli, con *odds ratio* (OR), intervallo di confidenza (IC) al 95% e *p*-value.

Tabella 4: Distribuzione delle frequenze alleliche nei pazienti SLA e nei controlli.

SNP		SLAs	CTRL	OR	IC 95%	<i>p</i> -value*
-653 A>G	Frequenza allele A	0.65	0.76	1.00*		
	Frequenza allele G	0.35	0.24	1.71	1.18-2.48	0.005
-651 G>A	Frequenza allele G	0.88	0.87	1.00*		
	Frequenza allele A	0.12	0.13	0.95	0.58-1.57	0.844
-617 C>A	Frequenza allele C	0.87	0.85	1.00*		
	Frequenza allele A	0.13	0.15	0.84	0.51-1.37	0.482

*Valore di riferimento per OR; *p*-value ottenuto con l'analisi del χ^2 .

Tabella 5: Distribuzione delle frequenze genotipiche nei pazienti SLA e nei controlli.

SNP	Genotipo	SLA N (%)	CTRL N (%)	OR	IC 95%	<i>p</i> -value*
-653A>G	AA	49 (35.0%)	78 (58.2%)	1.00*	-	-
	AG	83 (59.3%)	47 (35.1%)	2.81	1.70-4.66	0.0001
	GG	8 (5.7%)	9 (6.7%)	1.41	0.51-3.91	0.502
	AG+GG	91 (65%)	56 (41.8%)	2.59	1.59-4.22	0.0001
-651G>A	GG	105 (75%)	102 (76.1%)	1.00*	-	-
	GA	35 (25%)	29 (21.7%)	1.17	0.67-2.06	0.579
	AA	0	3 (2.2%)	0.00	-	0.081
	GA+AA	35 (25%)	32 (23.9%)	1.06	0.61-1.84	0.829
-617C>A	CC	106 (75.7%)	97(72.4%)	1.00*	-	-
	CA	33 (23.6%)	35 (26.1%)	0.86	0.50-1.49	0.598
	AA	1 (0.7%)	2 (1.5%)	0.46	0.04-5.13	0.598
	CA+AA	34 (24.3%)	37 (27.6%)	0.84	0.49-1.44	0.529

*Valore di riferimento per OR; *p*-value ottenuto con l'analisi del χ^2 .

Le frequenze alleliche e genotipiche nella popolazione analizzata rispettano l'equilibrio di *Hardy-Weinberg*.

L'analisi dei dati in relazione al polimorfismo -653A>G mostra una frequenza dell'allele -653G più elevata nei pazienti SLAs rispetto ai controlli (0.35 vs. 0.24, $p<0.01$); la frequenza dei soggetti eterozigoti -653AG ($p<0.001$) così come quella dei G carriers (-653 AG+GG) ($p<0.001$) risulta statisticamente più elevata nei pazienti rispetto ai controlli. Non risultano differenze statisticamente significative tra le frequenze dei soggetti omozigoti -653GG riscontrate nei due gruppi. Relativamente ai polimorfismi -651 G>A e -617 C>A sia le frequenze alleliche che quelle genotipiche non differiscono significativamente fra pazienti SLAs e controlli (Tabelle 4-5).

Inoltre, è stata verificata una possibile associazione tra i tre polimorfismi funzionali nel promotore del gene *NRF2* ed alcune caratteristiche cliniche ed evolutive della malattia, come il sito anatomico di esordio, l'età media d'insorgenza, il punteggio di ALSFRS, ottenuto al momento della diagnosi, e la durata di malattia. I dati clinici disponibili si riferiscono ad un sottogruppo di 100 pazienti.

Non sono emerse differenze statisticamente significative nella distribuzione delle frequenze genotipiche suddividendo i pazienti SLAs in base al sito anatomico di insorgenza della malattia, come mostrato nella tabella 6.

Tabella 6: Distribuzione delle frequenze genotipiche nelle sottopopolazioni di pazienti SLAs Bulbari e Spinali.

(N°Tot=100)	Genotipo	Bulbari N (%)	Spinali N (%)	P*
-653A>G	AA	6 (27.3%)	23 (29.5%)	1.00
	AG	15 (68.2%)	50 (64.1%)	
	GG	1 (4.5%)	5 (6.4%)	
-651G>A	GG	15 (68.2%)	58 (74.4%)	0.60
	GA	7 (31.8%)	20 (25.6%)	
	AA	0	0	
-617C>A	CC	14 (63.6%)	61 (78.2%)	0.34
	CA	8 (36.4%)	16 (20.5%)	
	AA	0	1 (1.3%)	

* P ottenuto tramite test esatto di Fisher.

L'analisi dei dati non ha mostrato differenze significative in relazione ai parametri clinici "età media di esordio" (Figura 13-A) e "punteggio della scala ALSFRS" (Figura 13-B) osservati nei

tre gruppi di pazienti -653AA, -653AG e -653GG. In relazione al parametro “durata di malattia” si osserva una riduzione, sebbene non significativa, della durata media di malattia (rispettivamente di 11 e 18 mesi) nei portatori dei genotipi -653AG e -653GG rispetto ai pazienti con genotipo -653AA (Fig 13-C). I valori medi dei tre parametri clinici non presentano differenze significative tra le classi di genotipi generati dai polimorfismi -651G>A e -617C>A (dati non mostrati).

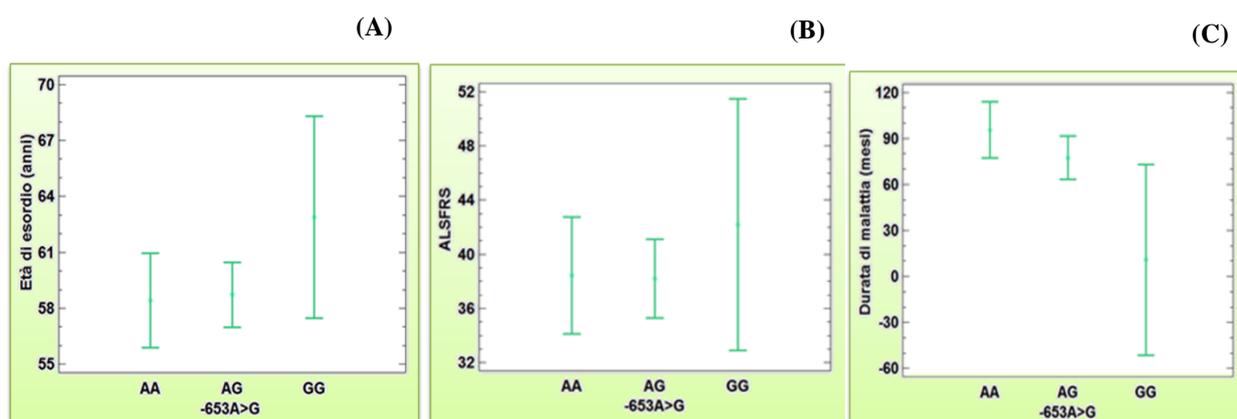


Figura 13: Età media di esordio (A), durata media della malattia (B), punteggio della scala funzionale dell’ALSFRS (C) nei pazienti SLAs suddivisi in base ai tre genotipi (AA, AG, GG) generati dal polimorfismo -653A>G.

5.2 VALUTAZIONE DEI BIOMARCATORI PLASMATICI DI STRESS OSSIDATIVO

I valori medi dei biomarcatori di stress ossidativo riscontrati nel gruppo di pazienti e di controlli sono mostrati nella tabella 7-A e 7-B.

Tabella 7-A: Valori medi e deviazione standard dei biomarcatori plasmatici AOPP, FRAP e tioli.

Biomarcatore	SLAs (N=140)	CTRL (N=134)	<i>p</i> -value*
AOPP (nmol/ml): media ± DS	387.2 ± 222.7	257.4 ± 112.3	1.48x10⁻⁵
FRAP (mmol/l): media ± DS	0.676 ± 0.356	0.727 ± 0.167	0.272
-SH (µmol/l): media ± DS	0.287 ± 0.154	0.437 ± 0.149	3.92x10⁻⁷

**p*-value ottenuto tramite ANOVA.

Tabella 7-B: Valori medi e deviazione standard dei biomarcatori plasmatici SOD e CAT.

Biomarcatore	SLAs (N=28)	CTRL (N=10)	<i>p</i> -value*
SOD (U/ml): media ± DS	17.84 ± 4.41	11.08 ± 2.20	0.0004
CAT (nmol/min/ml): media ± DS	26.47 ± 6.65	26.94 ± 5.77	0.732

**p*-value ottenuto tramite ANOVA.

Dalla valutazione dei dati riguardanti la componente pro-ossidante è emerso che i valori medi dei livelli plasmatici degli AOPP risultano significativamente più elevati nei pazienti SLAs rispetto ai controlli ($p < 0.001$). Per quanto riguarda la componente antiossidante, i livelli plasmatici medi della FRAP osservati nei pazienti non differiscono significativamente da quelli riscontrati nei controlli, mentre i valori medi dei tioli plasmatici risultano significativamente più bassi nei pazienti rispetto ai controlli ($p < 0.001$). I dati relativi agli antiossidanti enzimatici mostrano un aumento significativo del valore medio di attività della SOD nei pazienti rispetto ai controlli, mentre nessuna variazione si riscontra tra i valori medi dell'attività della CAT osservati nei due gruppi.

L'analisi di regressione lineare non ha mostrato alcuna relazione significativa tra l'età e i valori plasmatici di AOPP, FRAP e tioli sia considerando la popolazione totale che i due gruppi di pazienti e controlli separatamente (dati non mostrati).

La presenza di una possibile relazione fra i livelli dei vari biomarcatori analizzati è stata valutata nella popolazione dei pazienti: è stata osservata una relazione statisticamente significativa fra i valori di AOPP e FRAP ($p < 0.001$) (Figura 14-A) e fra i livelli di AOPP e gruppi tiolici totali ($p < 0.001$) (Figura 14-B); all'aumentare dei valori degli AOPP aumentano linearmente quelli delle FRAP e diminuiscono linearmente i valori dei tioli. Nessuna relazione significativa è emersa fra i livelli dei tioli e quelli delle FRAP (Figura 14-C).

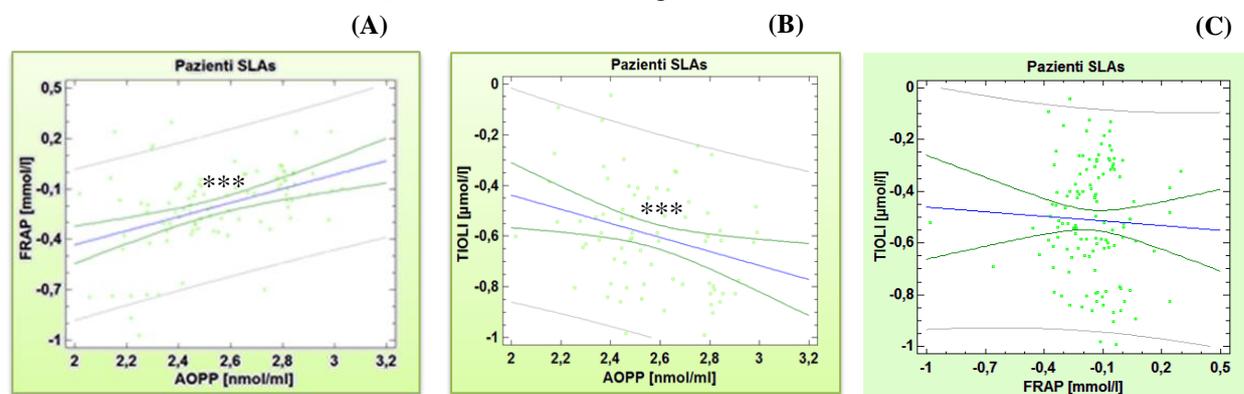


Figura 14: Regressione lineare fra i valori plasmatici degli AOPP e delle FRAP (A), fra i livelli di AOPP e -SH (B) e fra i valori plasmatici delle FRAP e dei -SH (C).

L'analisi di regressione lineare condotta per valutare un'eventuale correlazione fra biomarcatori analizzati e parametri clinici, relativi ai pazienti SLAs, mostra una relazione significativa sia dei livelli di AOPP che di -SH con l'ALSFRS ($p > 0.001$); in particolare un punteggio elevato della scala di funzionalità è associato a bassi livelli plasmatici degli AOPP (Figura 15-A) e ad alti livelli plasmatici dei gruppi tiolici totali (Figura 15-B).

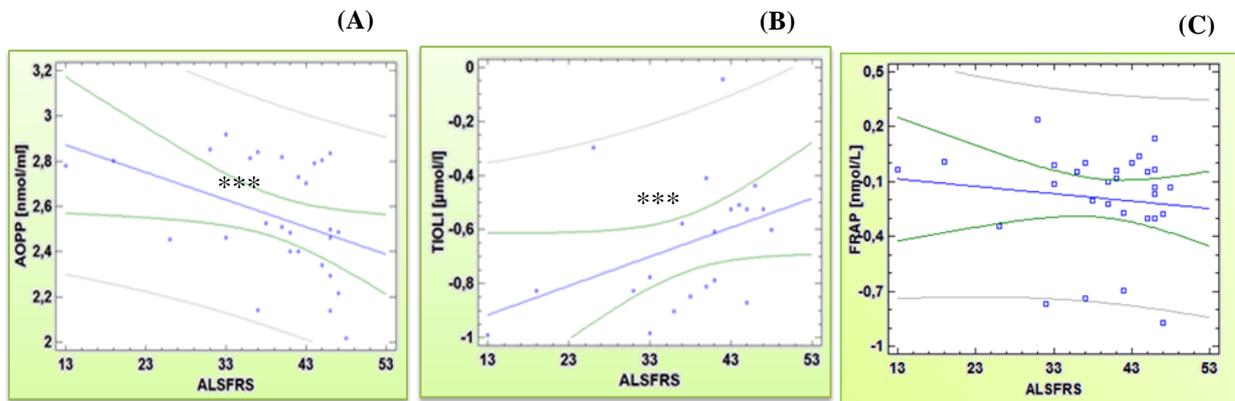
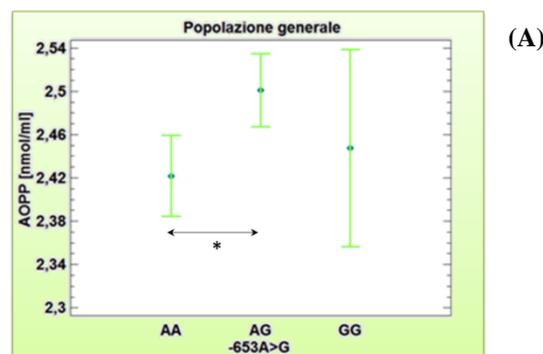


Figura 15: Regressione lineare fra il punteggio dell'ALSFRS e i valori plasmatici degli AOPP (A), dei gruppi tiolici totali (B), e della FRAP (C).

Non sono emerse relazioni significative fra i biomarcatori e gli altri parametri clinici valutati, ovvero età di insorgenza e durata media della malattia (dati non mostrati).

5.3 RELAZIONE TRA BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO E GLI SNPs NEL PROMOTORE DEL GENE *NRF2*

I livelli plasmatici dei biomarcatori di stress ossidativo analizzati (AOPP, FRAP e tioli) sono stati messi in relazione con gli SNPs nel promotore del gene *NRF2* (-653 A>G, -651 G>A, -617 A>C). I livelli medi di AOPP nella popolazione generale sono risultati significativamente più elevati nei portatori del genotipo -653AG rispetto ai -653AA carriers ($p < 0.05$) (Figura 16-A). Stratificando i dati nelle due sottopopolazioni di pazienti e controlli, tale differenza permane nel gruppo dei pazienti ($p = 0.01$) (Figura 16-B), ma non in quello dei controlli (Figura 16-C).



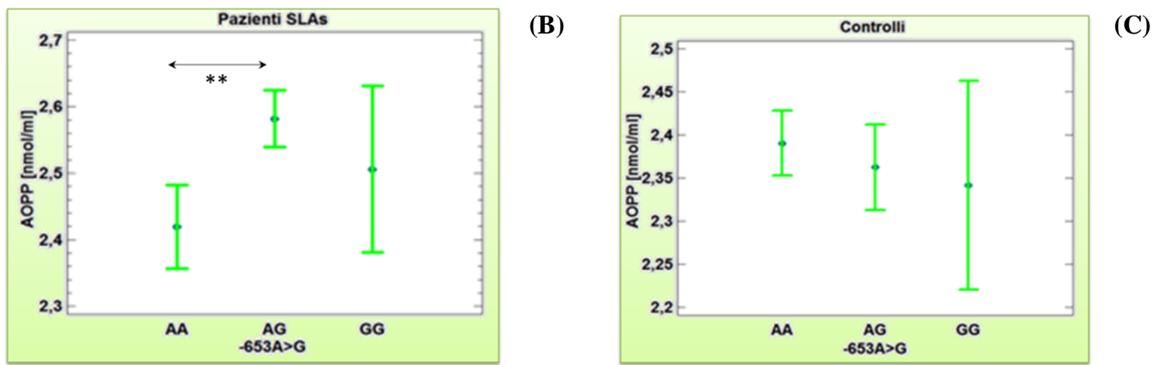


Figura 16: Livelli plasmatici medi degli AOPP nei soggetti con genotipo -653AA, -653AG e -653GG rispettivamente nella popolazione generale (A), nel gruppo dei pazienti (B) e in quello dei controlli (C).

Esaminando la popolazione generale e le due sottopopolazioni non sono emerse differenze statisticamente significative dei livelli di AOPP tra i genotipi generati dai polimorfismi -651G>A e -617C>A (dati non mostrati).

Considerando i livelli plasmatici delle FRAP in relazione al polimorfismo -653A>G, l'analisi statistica ha evidenziato nella popolazione generale una differenza significativa dei valori medi del biomarcatore tra i portatori del genotipo -653AA e i soggetti -653AG ($p < 0.05$) (Figura 17-A). Stratificando i dati nelle due sottopopolazioni di pazienti e controlli, la differenza permane nel gruppo dei pazienti ($p = 0,01$) (Figura 17-B), ma non in quello dei controlli (Figura 17-C).

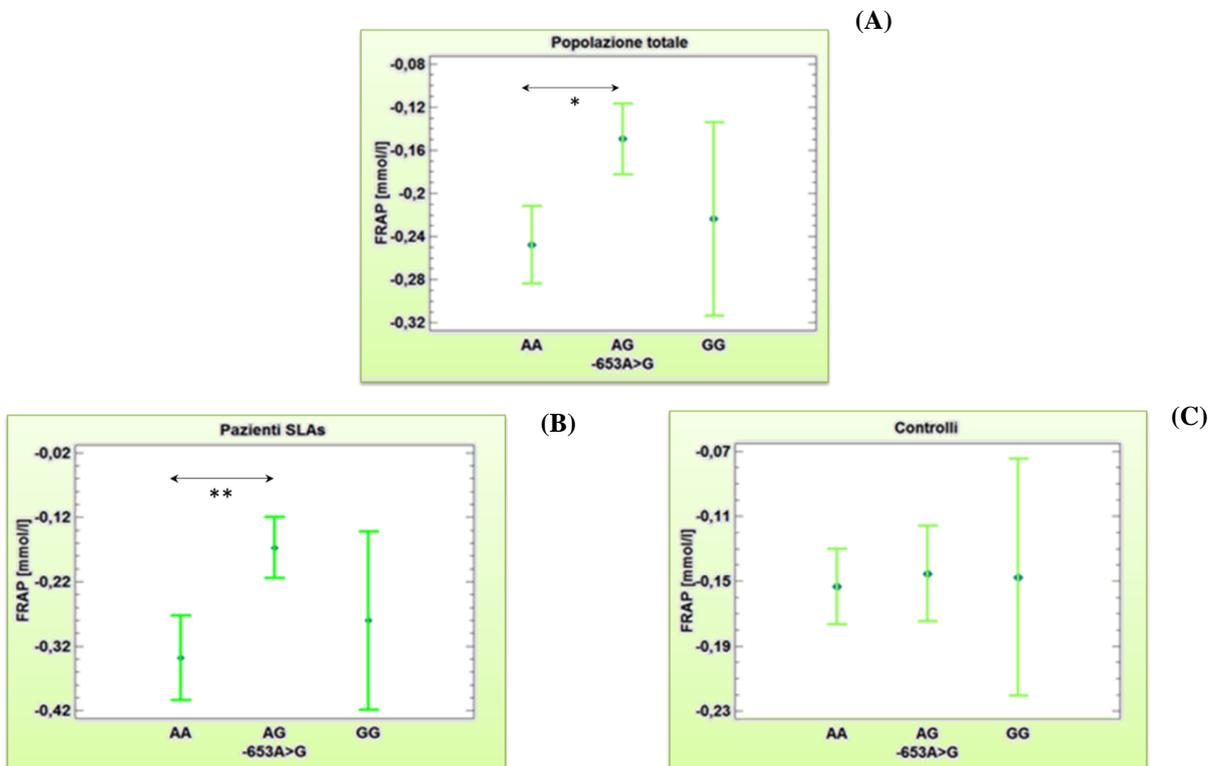


Figura 17: Livelli plasmatici medi delle FRAP nei portatori dei genotipi -653AA, -653AG e -653GG rispettivamente nella popolazione generale (A), nel gruppo dei pazienti (B) e in quello dei controlli (C).

Non sono state riscontrate differenze significative tra i livelli medi della FRAP relativi ai genotipi degli altri due polimorfismi -651G>A e -617C>A (dati non mostrati).

In relazione ai livelli plasmatici dei gruppi tiolici totali è stato osservato che, nella popolazione generale, il valore medio risulta significativamente più basso nei soggetti -653AG rispetto ai -653AA ($p<0.05$) (Figura 18-A). Considerando, invece, la popolazione dei pazienti e dei controlli separatamente, i livelli dei tioli riscontrati nei portatori dei tre genotipi seguono un *trend* di crescita dagli omozigoti GG, agli eterozigoti AG, fino agli omozigoti AA, sebbene tali valori non differiscano in modo significativo (Figura 18-B; 18-C).

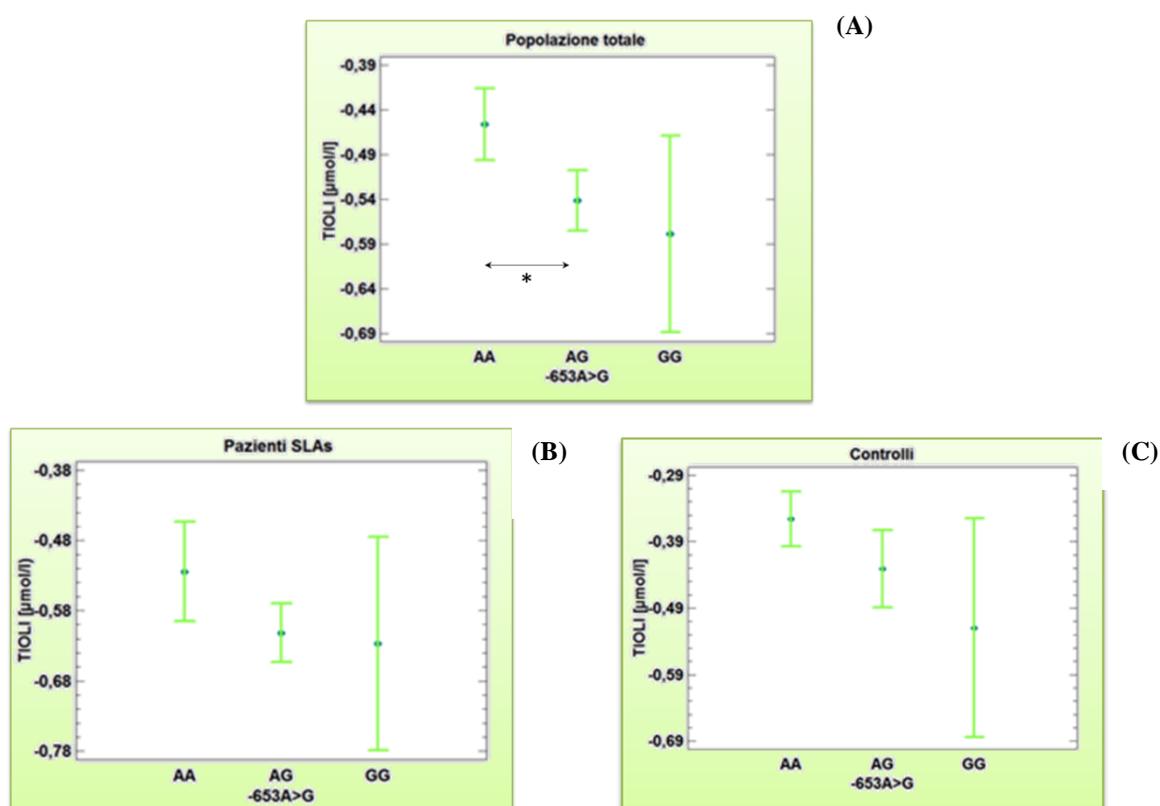


Figura 18: Livelli plasmatici medi dei gruppi tiolici totali nei portatori dei genotipi -653AA, -653AG e -653GG rispettivamente nella popolazione generale (A), nel gruppo dei pazienti (B) e in quello dei controlli (C).

Per quanto riguarda i valori dei tioli nella popolazione generale e nelle due sottopopolazioni di pazienti e controlli non sono state riscontrate variazioni significative tra i genotipi generati dal polimorfismo -651G>A e -617C>A (dati non mostrati).

La valutazione delle attività della SOD e della CAT sono state effettuate nella popolazione generale e non stratificando nelle popolazioni di pazienti e controlli dato l'esiguo numero di campioni analizzato. L'analisi statistica ha mostrato un significativo aumento dell'attività di

entrambi gli antiossidanti nei portatori del genotipo -617CA rispetto ai -617CC carriers ($p < 0.05$) (Figura 19-A; 19-B).

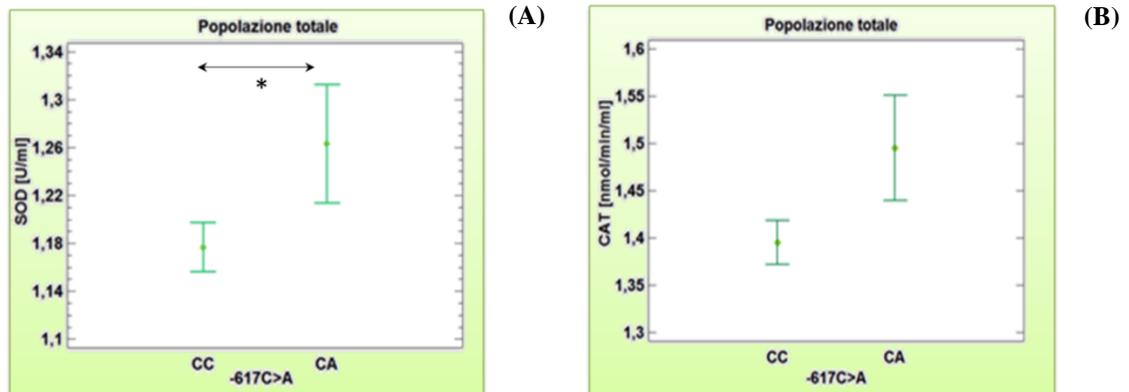


Figura 19: Livello medio di attività della SOD (A) e della CAT (B) nei soggetti portatori dei genotipi -617CC e -617CA.

L'attività della SOD risulta significativamente più bassa nei portatori del genotipo -651GA rispetto ai -651GG carriers ($p < 0.05$) (Figura 20-A) ed un trend simile si osserva per l'attività della CAT, sebbene i valori medi relativi ai due gruppi non differiscano significativamente fra loro (Figura 20-B).

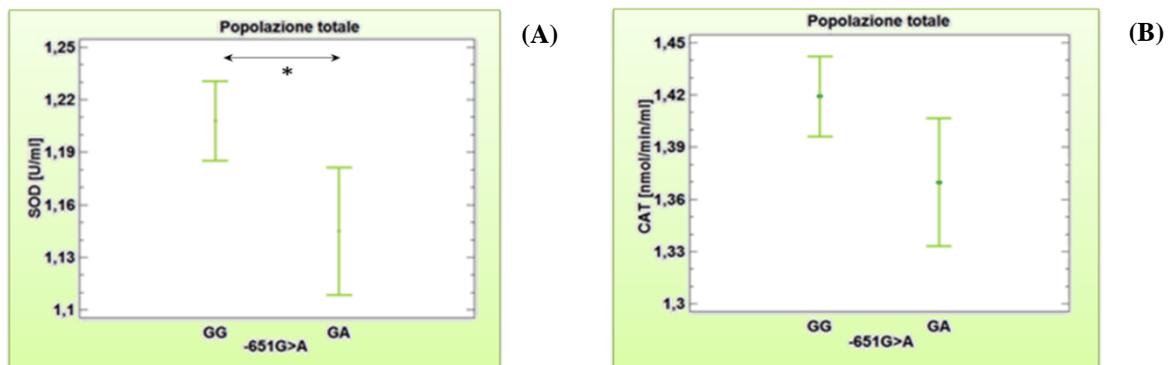


Figura 20: Livello medio di attività della SOD (A) e della CAT (B) nei soggetti portatori dei genotipi -651GG e -651GA.

Non si riscontrano, invece, variazioni significative nell'attività della SOD e della CAT tra i portatori dei diversi genotipi del polimorfismo -653A>G (dati non mostrati).

5. DISCUSSIONE

La fisiopatologia delle malattie neurodegenerative è ancora largamente sconosciuta; lo studio dei fattori di rischio legati allo sviluppo di tali patologie ha portato a definirle come complesse e multifattoriali, dato che sembrano essere il risultato di una interazione tra molteplici fattori genetici e ambientali. Attualmente, diverse teorie sono state elaborate per spiegare i meccanismi responsabili del danno e della morte delle cellule cerebrali; tra i diversi fenomeni presi in considerazione, lo stress ossidativo sembra giocare un ruolo patogenetico comune a molte malattie neurodegenerative, tra cui la SLA, il PD, l'AD e l'HD (Niedzielska et al., 2015; Li et al., 2013). Recentemente la degenerazione dei motoneuroni nella SLAs è stata strettamente associata con lo stress ossidativo che sembra essere in grado di interagire ed aggravare altri processi fisiopatologici che contribuiscono al danno dei motoneuroni, tra cui l'eccitotossicità glutammatergica, l'alterazione della funzionalità mitocondriale, l'aggregazione proteica, lo stress del reticolo endoplasmatico e le alterazioni nella segnalazione mediata dagli astrociti e dalla microglia (Mitsumoto et al., 2008; Turner et al., 2013). Per definizione lo stress ossidativo è il risultato di uno squilibrio tra la produzione di ROS e la loro rimozione dall'ambiente cellulare ad opera delle difese antiossidanti. Diverse evidenze in letteratura sostengono l'implicazione di un'eccessiva produzione di ROS nella morte neuronale che si verifica nella SLA; infatti, diversi autori hanno constatato la presenza di alterati livelli di biomarcatori di danno ossidativo nei pazienti SLA (Bogdanov et al., 2000; Aoyama et al., 2000; Bonnefont-Rousselot et al., 2000; Simpson et al., 2004; Kaufmann et al., 2004; Yoshino et al., 2006; Barber e Shaw, 2010). L'organismo umano per rispondere all'insulto ossidativo ha evoluto diversi sistemi di difesa; tra i possibili meccanismi coinvolti nella risposta antiossidante, la via mediata dal fattore di trascrizione Nrf2 è attualmente riconosciuta come uno dei principali *pathway* di difesa cellulare contro lo stress ossidativo. Nrf2 è un fattore di trascrizione ubiquitario che in condizioni basali è sequestrato nel citoplasma dal soppressore Keap1, il quale indirizza Nrf2 alla degradazione proteasoma-dipendente, anche se esistono altri metodi di degradazione del fattore di trascrizione indipendenti da Keap1, come quello mediato dal complesso GSK3/ β TrCP (Rada et al., 2012). In presenza di insulti elettrofilici o ossidanti, che modificano i residui tiolici di Keap1, il legame del soppressore ad Nrf2 viene destabilizzato e il fattore di trascrizione può entrare nel nucleo inducendo la risposta antiossidante (Li et al., 2009; Dinkova-Kostova et al., 2015). Nel nucleo, infatti, Nrf2 eterodimerizza con una delle *Small Maf Proteins* e lega le sequenze ARE presenti nel promotore di diversi geni bersaglio; in questo modo induce l'attivazione trascrizionale di enzimi antiossidanti e citoprotettivi di fase II, come l'eme ossigenasi-1 (HO-1), la NAD [P] H: chinone ossidoreduttasi-1 (NQO1), la superossido dismutasi (SOD), la glutatione S-transferasi

(GST), e la γ -glutamyl cisteina ligasi (γ -GCL) (Kundu e Surh, 2008). Pertanto, Keap1 e Nrf2 costituiscono un meccanismo attraverso il quale le cellule sono in grado di rilevare una condizione di stress ossidativo e indurre un'adeguata risposta (Sarlette et al., 2008; Petri et al., 2012).

Numerosi studi sono stati condotti allo scopo di indagare il ruolo del *pathway* Nrf2-ARE nelle patologie in cui vi è un coinvolgimento dello stress ossidativo e in particolare nelle malattie neurodegenerative. Studi condotti su modelli murini di SM hanno dimostrato che topi KO per Nrf2 presentano elevati livelli di mediatori proinfiammatori e conseguente peggioramento delle condizioni cliniche, mentre l'induzione di Nrf2 conferisce neuroprotezione (Johnson et al., 2010 (b); Pareek et al., 2011). Analogamente è stato dimostrato che l'utilizzo di induttori di Nrf2 in modelli murini di PD, HD e AD fornisce protezione contro gli insulti ossidativi e migliora rispettivamente la disabilità motoria nei topi PD e HD e la disfunzione cognitiva nei topi AD (Stack et al., 2010; Kim et al., 2013; Eftekharzadeh et al., 2010; Lou et al., 2014). Vargas e collaboratori (2005) hanno osservato bassi livelli di Nrf2 nei motoneuroni della corteccia motoria primaria di modelli murini di SLA (hSOD1G93A); tali motoneuroni sono risultati più suscettibili all'apoptosi indotta dal fattore di crescita nervoso (NGF). In uno studio successivo gli stessi autori hanno osservato che topi SLA hSOD1G93A sovraesprimenti il gene *NRF2*, selettivamente negli astrociti, presentano un aumento dell'espressione dei geni ARE-dipendenti coinvolti nella sintesi del glutatione rispetto a topi transgenici hSOD1G93A di controllo; ciò conferisce ai topi bitransgenici una migliore resistenza allo stress ossidativo indotto rispetto ai topi transgenici hSOD1G93A. Inoltre, la riduzione della sopravvivenza dei motoneuroni riscontrata in questi ultimi, a causa degli effetti tossici della SOD1 mutata, non è osservata nei topi sovraesprimenti Nrf2, facendo supporre un ruolo neuroprotettivo per Nrf2 (Vargas et al., 2008). A conferma del coinvolgimento di Nrf2 nella patogenesi della SLA, studi autoptici hanno mostrato una riduzione dell'mRNA e della proteina Nrf2 nei motoneuroni della corteccia motoria primaria e delle corna ventrali del midollo spinale dei pazienti SLA rispetto a tessuti prelevati da soggetti di controllo; è stata, inoltre, evidenziata una colocalizzazione della proteina Keap1 con le inclusioni intracellulari presenti nei motoneuroni del midollo spinale dei pazienti SLA (Sarlette et al., 2008; Tanji et al., 2013).

Particolare interesse è stato inoltre rivolto ad indagare se la presenza di alcuni polimorfismi nel promotore del gene *NRF2* potesse modificare l'espressione del gene stesso e la loro eventuale associazione con patologie neurodegenerative. L'attenzione è stata rivolta verso tre loci polimorfici, -617C>A (rs6721961), -651G>A (rs6706649) e -653A>G (rs35652124), per i quali è stata dimostrata da due gruppi indipendenti una funzione regolatoria nei confronti del gene *NRF2*; questi studi, condotti su due diverse linee cellulari, hanno utilizzato un *reporter assay* per

esaminare gli effetti dei polimorfismi rs35652124, rs6706649 e rs6721961 sull'espressione del gene reporter della luciferasi. I risultati hanno mostrato che in presenza di ciascuno dei tre SNPs nel promotore, l'espressione della luciferasi risulta attenuata. In particolare, Marczak e collaboratori hanno anche dimostrato che, in condizioni di stress, rispetto alle condizioni basali, si verifica un aumento dell'espressione genica, sia con il costrutto *wild type* che in presenza di ciascuna variante allelica minore; l'attività della luciferasi risulta comunque significativamente diminuita, rispetto al costrutto *wild type*, quando nel promotore è presente uno dei tre SNPs. Tali esperimenti suggeriscono che la presenza di almeno una delle tre varianti polimorfiche nel promotore di *NRF2* sia associata a ridotta espressione del gene stesso, soprattutto in condizioni di stress (Marzec et al., 2007; Marczak et al., 2012). Questi dati contrastano con quelli riportati dal portale GTEx, che non sembrano evidenziare, in diversi tipi di tessuti autoptici, variazioni dell'espressione genica in funzione dei tre SNPs. Si deve comunque considerare che per alcuni tessuti, come ad esempio la corteccia cerebrale, il numero di campioni raccolti per determinate classi genotipiche è molto basso. Inoltre, l'analisi condotta su tessuti *post mortem* non consente di valutare l'espressione genica in risposta a stimoli di stress. Conosciamo, invece, come la via Nrf2-ARE abbia un ruolo cruciale nell'attivare le difese cellulari proprio in risposta ad insulti ossidanti.

Ipotizzando un ruolo funzionale per i tre polimorfismi alcuni autori hanno indagato il loro ruolo nelle patologie neurodegenerative e hanno dimostrato che tali SNPs possono influenzare alcuni aspetti clinici associati con il PD e la SLA (Von Otter et al., 2010; Bergstrom et al., 2014). In particolare, è stato osservato che la presenza contemporanea degli alleli comuni AGC in corrispondenza dei tre loci -653, -651 e -617 ha un effetto protettivo in quanto è associata a minor rischio di sviluppare il PD (Von Otter et al., 2010; Von Otter et al., 2014); inoltre, l'aplotipo AGC sembra in grado di posticipare l'età di insorgenza sia del PD (Von Otter et al., 2010; Von Otter et al., 2014) che della SLA (Bergstrom et al., 2014). Al contrario la presenza della variante allelica -653G sembra anticipare l'età di insorgenza del PD (1.1 anno per allele) (Von Otter et al., 2014). Gli autori ipotizzano che l'effetto protettivo dell'aplotipo *wild type* (AGC) sia dovuto alla piena espressione genica di *NRF2* e che, al contrario, l'allele -653G sia responsabile di una ridotta trascrizione del gene stesso (Von Otter et al., 2014). Inoltre, un precedente lavoro del nostro gruppo ha mostrato associazione tra la variante allelica -653G e il rischio di insorgenza del *Mild Cognitive Impairment* (MCI) (dati non pubblicati).

Considerando queste evidenze, lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare il ruolo dei tre polimorfismi funzionali nel promotore del gene *NRF2*, nella risposta cellulare allo stress ossidativo, in una popolazione di pazienti SLAs e di controlli sani. Inizialmente è stata valutata la possibile associazione dei polimorfismi con l'insorgenza della malattia. I nostri

risultati indicano che la frequenza dell'allele -653G nella nostra popolazione di studio è significativamente più elevata nel gruppo dei pazienti SLAs rispetto ai controlli (0.35 vs 0.24) dimostrando che tale variante allelica è associata ad un aumento del rischio di malattia (OR 1.71 IC95% 1.18-2.48).

Relativamente ai polimorfismi -651 G>A e -617 C>A non abbiamo riscontrato differenze significative tra pazienti e controlli, esaminando sia le frequenze alleliche che quelle genotipiche. I nostri risultati sono in linea con gli studi presenti in letteratura, in cui non sono stati riportati finora associazioni fra i singoli polimorfismi -651G>A e -617C>A e patologie neurodegenerative. Comunque occorre considerare che la frequenza con cui le due varianti minori -651A e -617A si presentano nelle due popolazioni di pazienti e controlli è piuttosto bassa; pertanto per ottenere un dato attendibile inerente una loro eventuale associazione con la malattia, dovremmo ampliare il campione di studio.

Gli SNPs -653A>G e -651G>A sono localizzati nella regione StRE del promotore di *NRF2* deputata al legame con il fattore di trascrizione Mzf1 che, riconoscendo la sua sequenza consenso, media la trascrizione di *NRF2*. La presenza di una o di entrambe le varianti alleliche rare provoca una modifica nella sequenza nucleotidica che potrebbe compromettere la stabilità del legame di Mzf1 con il promotore e conseguente riduzione dell'espressione di Nrf2 (Marzec et al., 2007). I risultati di questa tesi attribuiscono allo SNP -653A>G, piuttosto che al -651G>A, un ruolo predominante nel meccanismo di attivazione dell'espressione di *NRF2*, almeno per quanto concerne il gruppo di pazienti SLAs analizzati. Possiamo quindi supporre che la presenza dell'allele -653G conduca ad un deficit di espressione della proteina Nrf2 e conseguente attenuazione del *pathway* Nrf2-ARE; ciò potrebbe inficiare la risposta antiossidante cellulare rendendo i soggetti portatori dell'allele -653G più suscettibili a sviluppare SLA. Ciononostante non possiamo affermare che lo SNP sia elitario per la SLA o, in generale, per le patologie neurodegenerative, dato che numerosi studi mostrano come tale allele sia associato all'insorgenza o al fenotipo clinico di altre malattie correlate allo stress ossidativo come quelle polmonari (Hua et al., 2010), cardiovascolari (Shimoyama et al., 2014), gastrointestinali (Arisawa et al., 2007; Arisawa et al., 2008 b) e tumorali (Arisawa et al., 2008 a Arisawa et al., 2008 c). Gli studi presenti in letteratura e i dati di questa tesi fanno ipotizzare che la variante allelica -653G sia implicata nei meccanismi che inducono un incremento dello stress ossidativo nelle patologie in cui tale fenomeno risulta giocare un ruolo chiave.

Nella popolazione di pazienti SLAs studiata in questa tesi il polimorfismo -653A>G non sembra comunque influenzare né l'età di insorgenza della malattia, né la forma clinica (bulbare o spinale) né il punteggio dell'ALSFRS; nonostante non siano state evidenziate differenze significative della durata media di malattia tra i gruppi genotipici, si nota comunque una

riduzione di tale parametro (rispettivamente di 11 e 18 mesi) nei portatori dei genotipi -653AG e -653GG rispetto ai pazienti con genotipo -653AA. Se, aumentando la casistica, questo *trend* dovesse essere confermato con differenze statisticamente significative, potremmo ipotizzare che la variante allelica -653G, oltre a costituire un fattore di rischio per la forma sporadica di SLA, possa avere effetti anche sulla sua progressione, accelerandone l'evoluzione.

Allo scopo di effettuare una valutazione "globale" della condizione di stress ossidativo, che tenesse conto sia della componente pro-ossidante che di quella antiossidante, nei nostri pazienti SLA rispetto al gruppo di controllo, abbiamo misurato i livelli plasmatici degli AOPP, come marker di danno ossidativo alle proteine, della FRAP e dei gruppi tiolici totali, come marcatori antiossidanti non enzimatici; l'attività della SOD e della CAT, come indici della barriera antiossidante enzimatica, sono stati valutati in un sottogruppo di pazienti e in un piccolo gruppo di controllo. I risultati ottenuti mostrano un aumento significativo dei livelli plasmatici degli AOPP nei pazienti rispetto ai controlli, avvalorando l'ipotesi della presenza di danno ossidativo nella SLA. Questi risultati sono in accordo con precedenti studi che indicano lo stress ossidativo come un evento implicato nella malattia. Bogdanov e collaboratori (2000), ad esempio, hanno riscontrato elevati livelli di 8OHdG nel CSF e nelle urine di pazienti SLA rispetto ai controlli sani. Alti livelli di HNE, un prodotto della perossidazione lipidica, sono stati riscontrati nel siero, nel CSF e nelle urine di pazienti con SLAs rispetto a individui affetti da altre malattie neurodegenerative e a soggetti di controllo (Simpson et al., 2004; Kabuta et al., 2015). Analogamente, sono stati riscontrati elevati livelli di F2-IsoPs nelle urine di soggetti con SLAs, rispetto ai controlli (Mitsumoto et al., 2008). Altri lavori presenti in letteratura hanno riportato che la quantità di prostaglandina E2 e la concentrazione di ossido di azoto, due mediatori dell'infiammazione coinvolti nella produzione di radicali liberi, sono elevate nel siero e nel CSF di pazienti SLA rispetto a soggetti sani (Iłzecka et al., 2003; Simpson et al., 2004; Babu et al., 2008). Inoltre, a livello del SNC di topi e pazienti SLA, sono stati riscontrati elevati livelli di nitrotirosina; la nitratura della tirosina, mediata dal perossinitrito, rappresenta un potenziale meccanismo che porta alla morte neuronale in molte malattie neurodegenerative, tra cui la SLA (Beckman et al., 2004). Un precedente lavoro di Siciliano e collaboratori (2007) evidenzia elevati livelli di AOPP sia nel plasma che nel CSF di pazienti SLA rispetto ai controlli.

I nostri risultati mettono inoltre in evidenza nei pazienti SLA una riduzione dei livelli plasmatici dei gruppi tiolici totali, rispetto ai controlli, confermando precedenti studi che evidenziavano una diminuzione delle riserve antiossidanti nella SLA. In accordo con i nostri dati, uno studio, condotto su eritrociti di sangue periferico, ha riscontrato bassi livelli dei gruppi tiolici totali nei pazienti SLAs rispetto ai soggetti di controllo (Baillet et al., 2010). Babu e collaboratori (2008) hanno dimostrato la presenza di una bassa concentrazione di GSH, il più abbondante

antiossidante tiolico endogeno intracellulare, negli eritrociti di pazienti SLA, e tale riduzione è correlata con la durata della malattia; un altro studio ha mostrato bassi livelli di GSH nei motoneuroni corticali di pazienti SLA rispetto ai controlli (Weiduschat et al., 2014). I dati presenti in letteratura a riguardo risultano essere comunque contrastanti; Kokić e collaboratori (2005) hanno osservato concentrazioni più elevate sia di acido urico che di proteine tioliche totali nel CSF di pazienti SLAs rispetto ai controlli; in un altro lavoro non sono emerse differenze nei livelli di GSH e di GSSG, così come nel loro rapporto, tra pazienti SLA e controlli (Baillet et al., 2010). Keizman e collaboratori (2009) hanno rilevato nei pazienti SLA, rispetto ai controlli, bassi livelli sierici di acido urico, che rappresenta il 60% del valore della FRAP; contrariamente a tale dato, in questo studio non è stata riscontrata una riduzione dei valori della FRAP, facendo supporre che questa classe di antiossidanti non sia compromessa almeno nel gruppo di pazienti analizzato in questa tesi.

I dati ottenuti nel presente studio, inoltre, hanno evidenziato nei pazienti, ma non nei controlli, un'associazione tra i livelli degli AOPP e quelli dei biomarcatori antiossidanti non enzimatici; in particolare ad elevati livelli plasmatici degli AOPP corrispondono alti valori plasmatici della FRAP e ridotti livelli dei gruppi tiolici totali. Quest'ultimo dato è a supporto dell'ipotesi di una ridotta funzionalità del sistema Nrf2-ARE nei nostri pazienti, probabilmente per l'elevata frequenza con cui l'allele -653G si presenta nella popolazione SLAs. Infatti, il glutatione, che rappresenta il principale antiossidante endogeno tiolico, è prodotto direttamente da Nrf2 che controlla la trascrizione dell'enzima limitante per la sua sintesi (Ghosh et al., 2013). La relazione diretta riscontrata tra AOPP e FRAP fa supporre che nei nostri pazienti la risposta cellulare allo stress ossidativo sia mediata prevalentemente da molecole la cui espressione non è direttamente controllata dal sistema Nrf2-ARE. Inoltre, pazienti con basso punteggio dell'ALSFRS, quindi con una peggiore funzionalità motoria, presentano elevati livelli di ossidazione proteica e ridotti valori dei gruppi tiolici totali mentre pazienti con alto punteggio della scala di funzionalità mostrano ridotta ossidazione proteica ed elevati livelli di -SH.

I dati relativi ai biomarcatori di stress ossidativo hanno quindi permesso di rilevare nei pazienti SLAs un alterato equilibrio redox e di associarlo al grado di compromissione della loro funzionalità motoria. Tali risultati confermano quindi la maggior parte dei dati di letteratura, che indicano lo stress ossidativo come fattore chiave nei meccanismi patogenetici della SLA.

Successivamente sono state confrontate le attività della SOD e della catalasi misurate nel gruppo dei pazienti SLAs e nei controlli. Contrariamente a quanto potevamo aspettarci, non sono stati riscontrati deficit di tale componente antiossidante nei pazienti SLAs; in questi ultimi, infatti, l'attività della SOD risulta significativamente aumentata e quella della catalasi invariata rispetto ai controlli. Nonostante diversi studi riportino la presenza di bassa attività della SOD (Baillet et

al., 2010; Boll et al., 2004) e della catalasi (Babu et al., 2008; Baillet et al., 2010) sia negli eritrociti che nel CSF di pazienti SLA, altre evidenze di letteratura mostrano dati opposti. In particolare, alcuni lavori hanno riscontrato, nei pazienti SLA rispetto ai controlli, un'elevata attività della SOD negli eritrociti e nel CSF (Jacobsson et al., 2001; Kokić et al., 2005; Tuncel et al., 2006) mentre Babu e collaboratori hanno osservato un'invariata attività della SOD eritrocitaria (Babu et al., 2008).

Un'elevata attività della SOD, riscontrata in soggetti SLA, non costituisce comunque un fenomeno necessariamente positivo da correlare ad una maggiore capacità antiossidante. Innanzitutto un'eccessiva attività dismutasica nell'organismo andrà ad alterare il fisiologico equilibrio ossidoriduttivo senza per altro conferire alla cellula maggiore protezione nei confronti dell'insulto ossidativo. Infatti, i pazienti analizzati nel presente lavoro di tesi presentano elevati livelli di ossidazione proteica nonostante l'elevata attività della SOD. Inoltre, è noto che mutazioni nel gene SOD1 sono responsabili delle forme ereditarie della malattia (Abel et al., 2012). A supporto del ruolo centrale svolto dalla proteina nella patologia, i modelli murini di SLA, come i topi G93A, sono generati inserendo il gene SOD1 mutato (Gurney, 1997). L'esatto meccanismo patologico mediato dalla SOD1 è attualmente sconosciuto, ma non sembra legato ad una perdita di attività; è stato infatti dimostrato che topi knock-out per SOD1 non sviluppano la malattia (Reaume et al., 1996). Tra le ipotesi formulate è stato proposto che l'enzima abbia un effetto tossico e che contribuisca alla neurodegenerazione con un meccanismo di tipo *gain of function* (Robberecht, 2000; Massimalany et al., 2013). Nei topi portatori della mutazione SOD1 G93A si riscontra un aumento della funzione enzimatica con maggiore formazione di radicali liberi rispetto a modelli murini di controllo (Gurney, 1997). Inoltre, è stato supposto che alcuni meccanismi patogenetici sottostanti alle forme di SLA di tipo SOD1-positive siano condivisi con le forme sporadiche di malattia (Turner et al., 2013). In uno studio condotto da Cova e collaboratori (2006) è stato postulato che nei pazienti con SLA l'aumento intracellulare di ROS potrebbe indurre una modifica post-traslazionale della proteina SOD1 wild-type; questa assumerebbe così effetti tossici in modo simile alla SOD1 mutata che si osserva nei casi di SLA. Tale tossicità, inoltre, è stata descritta anche nell'AD e nel PD (Choi et al., 2005). Possiamo quindi supporre che l'elevata attività della SOD, riscontrata nei nostri pazienti, potrebbe essere correlata ad una alterazione della proteina che si instaura, ad esempio, a seguito di modifiche post-traduzionali. Ciò si potrebbe tradurre in un meccanismo di tipo *gain of function* tossico per la cellula, così come avviene in presenza di mutazioni del gene SOD1.

Occorre comunque considerare che l'elevata attività della SOD riscontrata nei pazienti SLA di questo studio potrebbe essere anche attribuita a meccanismi compensatori messi in atto per rispondere all'elevato danno ossidativo laddove il *pathway* Nrf2-ARE risulta compromesso. In

effetti, la trascrizione del gene SOD1 viene regolata oltre che da Nrf2, anche da altri fattori di trascrizione (NFkB, AHR/ARNT C/EBP SP-1, AP-1, EGR-1) responsabili della sua attivazione sia in condizioni basali che in risposta a stress di varia natura, come esposizione a citochine, ROS e stress ossidativo (Hitchler e Domann, 2014). Possiamo quindi ipotizzare che in pazienti in cui si registra un aumento dello stress ossidativo accompagnato da un deficit del sistema Nrf2, per far fronte alla situazione dannosa registrata a livello cellulare, vengano attivate altre vie di regolazione del gene SOD1, che normalmente agiscono in sintonia con Nrf2. Questi meccanismi alternativi, anche se da un lato portano ad aumentare l'attività SOD, dall'altro probabilmente non sono sufficienti a bloccare la cascata ossidativa in corso.

Tuttavia, i dati ottenuti devono essere interpretati con la dovuta riserva dato che lo studio degli enzimi antiossidanti è preliminare e mostra qualche limite: la valutazione dell'attività della Sod totale e della Cat è stata effettuata solo su un ristretto numero di soggetti; inoltre, il dosaggio dell'attività di questi due enzimi, eseguito mediante kit commerciale in un'unica seduta, permette di misurare l'attività e non la quantità della proteina; ci riserviamo pertanto in studi futuri di ampliare la casistica ed effettuare sia un'analisi quantitativa del profilo di espressione del gene SOD che un'analisi qualitativa della proteina, in modo da definire meglio il significato dei risultati ottenuti.

Allo scopo di valutare l'eventuale effetto dei tre polimorfismi -653A>G, -651G>A e -617C>A sui livelli dei biomarcatori analizzati sono stati infine confrontati i livelli plasmatici medi di AOPP, FRAP e gruppi tiolici totali riscontrati nei portatori dei diversi genotipi, prendendo in esame rispettivamente la popolazione totale, il gruppo dei pazienti e il gruppo dei controlli. È importante sottolineare che la suddivisione della popolazione totale in pazienti e controlli o sottogruppi di questi e successivamente in classi genotipiche, comporta inevitabilmente il fatto che alcune di esse possano contare un numero minimo o addirittura nullo di osservazioni; di conseguenza, l'analisi dei dati relativi ad esempio a genotipi omozigoti di un allele raro, può fornire risultati condizionati da questo limite.

I nostri risultati non evidenziano alcuna differenza dei livelli medi di AOPP, FRAP e -SH tra i soggetti portatori dei diversi genotipi dei polimorfismi -651G>A e -617C>A. Un aumento significativo dei livelli plasmatici degli AOPP e della FRAP è stato invece osservato nei portatori del genotipo -653AG rispetto ai soggetti -653AA sia nella popolazione totale, che nel gruppo dei pazienti, ma non in quello dei controlli. Al contrario, i livelli plasmatici dei gruppi tiolici totali risultano ridotti nei soggetti -653AG rispetto a quelli -653AA, nella popolazione totale; un *trend* di riduzione con andamento simile è stato riscontrato solo nei pazienti, seppure non venga raggiunta la significatività. Conosciamo, dai dati presenti in letteratura, il ruolo cruciale di Nrf2 nel mediare l'omeostasi redox e nella protezione cellulare, principalmente

attraverso l'attivazione trascrizionale dei geni ARE-dipendenti. Tra questi troviamo geni codificanti per gli enzimi coinvolti nella sintesi di GSH (Satoh et al., 2013) e in quella delle tioredossine (TRX), proteine tioliche con funzione complementare a quella del GSH (Kim et al., 2003); è stato dimostrato che gli agenti riducenti come il GSH e le proteine tioliche (tioredossina) proteggono le cellule dall'apoptosi (Sandstrom et al., 1994; Gabby et al., 1996). A sostegno di ciò, gli esperimenti condotti da Shih (2003) e da Vargas (2008), precedentemente descritti, dimostrano come la sovraespressione indotta di Nrf2 conferisca neuroprotezione attraverso un incremento della produzione del glutatione. Possiamo quindi supporre che un deficit del sistema Nrf2-ARE, provocato ad esempio da varianti polimorfiche presenti nel promotore di *NRF2*, possa inficiare questi meccanismi di difesa cellulare indotti da Nrf2, compromettendo quindi la loro funzione neuroprotettiva.

L'osservazione che soggetti -653AG, rispetto ai -653AA, presentano aumentati livelli di FRAP associati ad elevata ossidazione proteica e a bassa concentrazione dei gruppi tiolici totali è a sostegno dell'ipotesi, precedentemente avanzata sul ruolo della FRAP; questi dati confermano, infatti, che in presenza di un malfunzionamento della via Nrf2-ARE, si produca una risposta compensatoria nella quale all'aumentare del danno ossidativo alle proteine aumenta la produzione di antiossidanti plasmatici non direttamente controllati da Nrf2.

Infine, l'intento di valutare l'attività degli enzimi antiossidanti SOD totale e catalasi nei portatori dei genotipi generati dai tre polimorfismi, ha comportato una ulteriore frammentazione dei dati, dato l'esiguo numero dei campioni dosati. Suddividendo infatti la popolazione generale in pazienti e controlli e nei relativi genotipi venivano casualmente a mancare osservazioni in alcune importanti classi genotipiche come per esempio quelle relative agli omozigoti *wild type* -653AA nel gruppo dei pazienti. L'analisi statistica è stata quindi condotta solamente sulla popolazione generale; ciononostante, nel gruppo di soggetti analizzati non figuravano portatori dei genotipi -651AA e -617AA, probabilmente a causa delle basse frequenze con cui le varianti alleliche rare si presentano nella popolazione di studio. I risultati evidenziano una attività della SOD più elevata nei soggetti -617AC rispetto ai -617CC e ridotta nei portatori del genotipo -651GA rispetto ai -651GG. Un *trend* simile è stato osservato per quanto riguarda l'attività della catalasi, per quanto le variazioni non risultino significative. Non sono state riscontrate, inoltre, differenze significative nell'attività dei due enzimi tra i portatori dei genotipi relativi al polimorfismo -653A>G. Tali dati risultano contrastanti e difficilmente interpretabili. Per meglio valutare l'effetto dei polimorfismi sui livelli di questi enzimi antiossidanti occorre sicuramente ampliare il campione affinché tutte le classi genotipiche siano sufficientemente rappresentate.

I dati ottenuti nel presente lavoro di tesi hanno evidenziato nei pazienti SLAs un alterato equilibrio redox così come un legame tra la presenza del genotipo -653AG e la condizione di

stress ossidativo confermando il ruolo neuroprotettivo di Nrf2. È noto che tessuti diversi presentano differente suscettibilità allo stress ossidativo; soprattutto il SNC, per le sue caratteristiche anatomiche e per la sua fisiologia, risulta essere ipersensibile alle ROS (Emerit et al., 2004). Il mantenimento di un'adeguata omeostasi redox a livello cerebrale è importante per preservare le normali funzioni cerebrali (Yang et al., 2015). A questo riguardo Nrf2 gioca un ruolo centrale attivando la trascrizione di enzimi antiossidanti indispensabili per la difesa contro lo stress ossidativo cerebrale. Numerose evidenze indicano che l'attivazione di Nrf2 è associata ad effetti neuroprotettivi: diverse molecole sono state identificate come induttori di Nrf2 e sono state studiate come possibili trattamenti per la neurodegenerazione. Ad esempio, la somministrazione di SFN, un induttore di Nrf2, migliora le disfunzioni cognitive e il *synthetic oleanane triterpenoid-methylamide* (CDDO-MA), un potente attivatore di Nrf2, migliora la memoria spaziale, riduce lo stress ossidativo e i livelli di A β -42 in modelli murini di AD (Dumont et al., 2009). Inoltre, un flavonoide, la naringerina, induce effetti neuroprotettivi, tramite la via di Nrf2, in risposta all'insulto ossidativo mediato dal 6-OHDA in cellule SH-SY5Y (modello HD) (Gao et al., 2015). In modelli murini di SM è stato osservato che l'uso di dimetilfumarato (DMF), altro induttore di Nrf2, reprime la produzione di mediatori pro-infiammatori (Liu et al., 2014). La somministrazione sistemica *postonset* di N-(4-(2-pyridyl)(1,3-thiazol-2-yl))-2-(2,4,6-trimethylphenoxy) acetamide (CPN-9) a modelli murini SODH46R di SLA sostiene le funzioni motorie e ritarda la progressione della malattia dopo l'insorgenza (Kanno et al., 2012). Successivamente, lo stesso gruppo di ricercatori ha scoperto un'altra molecola, attivatrice del *pathway* Nrf2-ARE, in grado di proteggere i neuroni dalla morte cellulare indotta dallo stress ossidativo: 2- [mesitile (metil) ammino] -N- [4- (piridin-2-il) -1H-imidazolo-2-yl] acetamide triclorigrato (WN1316). Questa molecola è solubile in acqua e presenta un'alevata permeabilità della barriera ematoencefalica rispetto al CPN-9; è stata somministrata *postonset* sia a topi SOD1H46R che a SOD1G93A ed è stato dimostrato che i modelli murini presentano un ritardo nella perdita dei motoneuroni del midollo spinale, la preservazione della funzionalità motoria e un miglior tasso di sopravvivenza (Tanaka et al., 2014). Questi studi suggeriscono il *pathway* Nrf2/ARE come possibile target terapeutico per le malattie neurodegenerative (Johnson e Johnson, 2015). Attualmente il DMF (BG-12) della Biogen Idec è stato approvato dalla FDA come trattamento terapeutico per la SM e, recentemente, è stato intrapreso un trial clinico per l'atassia di Friedreich utilizzando l'RTA 408 (*ClinicalTrials.gov Identifier* NCT02255435), un triterpenoide sintetico che attiva la risposta antiossidante attraverso Nrf2. Possiamo quindi ipotizzare che molecole induttrici di Nrf2 potrebbero essere utilizzate anche come trattamento per migliorare le difese cellulari in risposta a stress ossidativo ed infiammatorio anche nei pazienti affetti da SLA.

6. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi mostrano elevati livelli di ossidazione proteica e ridotti livelli di proteine tioliche totali nei pazienti SLAs rispetto ai controlli sani; inoltre, pazienti con funzionalità motoria più compromessa presentano una peggiore condizione di stress ossidativo. Questi dati confermano il ruolo patogenetico dello stress ossidativo nella malattia.

Lo studio dei polimorfismi presenti nel promotore del gene *NRF2* ha evidenziato un'associazione tra la variante polimorfica -653G e il rischio di insorgenza di SLAs. Inoltre, tale variante allelica sembra influenzare i livelli dei biomarcatori di stress ossidativo analizzati.

Questi dati sembrano dimostrare un forte coinvolgimento dello stress ossidativo e un deficit del sistema Nrf2-ARE nella patogenesi della forma sporadica di SLA; possiamo quindi ipotizzare che in presenza della variante -653G il sistema di difesa direttamente controllato da Nrf2 sia attenuato rendendo i soggetti portatori più suscettibili all'insulto ossidativo.

In accordo con altri studi presenti in letteratura (Dumont et al., 2009; Gao et al., 2015; Liu et al., 2014; Tanaka et al., 2014), i risultati di questo lavoro di tesi indicano il *pathway* Nrf2/ARE come un importante mediatore della neuroprotezione e suggeriscono tale via come possibile target terapeutico per le malattie neurodegenerative.

7. BIBLIOGRAFIA

Abel O, Powell JF, Andersen PM, Al-Chalabi A “ALSoD: A user-friendly online bioinformatics tool for amyotrophic lateral sclerosis genetics.” *Hum Mutat.* 2012 Sep;33(9):1345-51.

Agar J, Durham H. “Relevance of oxidative injury in the pathogenesis of motor neuron diseases.” *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2003;4(4):232–242.

Al-Chalabi A, Calvo A , Chio, Colville S, Ellis CM, Hardiman O, Heverin M5, Howard RS, Huisman MH, Keren N, Leigh PN, Mazzini L, Mora G, Orrell RW6, Rooney J, Scott KM, Scotton WJ, Seelen M, Shaw CE, Sidle KS, Swingler R, Tsuda M, Veldink JH, Visser AE, van den Berg LH, Pearce N “Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study.” *Lancet Neurol.* 2014 Nov;13(11):1108-13.

Andersen PM, Al-Chalabi A “Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know?” *Nat Rev Neurol.* 2011 Oct 11; 7(11):603-15

Anderson CM, Swanson RA “Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions.” *Glia.* 2000 Oct;32(1):1-14.

Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. “ Methods for testing antioxidant activity.” *Analyst;* 127, 1. 2002 183-198.

Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, et al. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* 2000 Apr;47(4):524–7.

Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. “NRF2 gene promoter polymorphism and gastric carcinogenesis.” *Hepato-Gastroenterology.* 2008;55(82-83):750–754. (a)

Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. “NRF2 gene promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in a Japanese population.” *Hepato-Gastroenterology.* 2008;55(82-83):394–397 (b)

Arisawa T, Tahara T, Shibata T. “The influence of promoter polymorphism of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 gene on the aberrant DNA methylation in gastric epithelium.” *Oncology Reports.* 2008;19(1) (c)

Arisawa T, Tahara T, Shibata T. “The relationship between *Helicobacter pylori* infection and promoter polymorphism of the NRF2 gene in chronic gastritis.” *International Journal of Molecular Medicine.* 2007;19(1):143–148.

Babu GN, Kumar A, Chandra R, Puri SK, Kalita J, Misra UK. Elevated inflammatory markers in a group of amyotrophic lateral sclerosis patients from northern India. *Neurochemical Research.* 2008;33(6):1145–1149.

Baillet A, Chantepedrix V, Trocmé C, Casez P, Garrel C, Besson G “The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease.” *Neurochem Res.* 2010 Oct;35(10):1530-7.

Baird L, Swift S, Llères D, Dinkova-Kostova AT. "Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells." *Biotechnol Adv.* 2014 Nov 1;32(6):1133-44

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G "Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase." *CRC Crit Rev Biochem.* 1987;22(2):111-80.

Bär M, Falcke M, Levine H, Tsimring LS. "Discrete stochastic modeling of calcium channel dynamics." *Phys Rev Lett.* 2000 Jun 12;84(24):5664-7.

Barber SC, Shaw PJ "Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target." *Free Radic Biol Med.* 2010 Mar 1;48(5):629-41.

Beckman JS, Estevez AG. Superoxide Dismutase Oxidative Stress and ALS. Am. 2004 In: h,editor.

Belzil VV, Bauer PO, Prudencio M, et al. Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):895–905.

Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prella A, Moggio M, Braga M, Silani V, De Biasi S. "Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity." *J Neurol Sci.* 2001 Oct 15;191(1-2):25-33

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6.

Bergström P, von Otter M, Nilsson S, Nilsson AC, Nilsson M, Andersen PM, Hammarsten O, Zetterberg H "Association of NFE2L2 and KEAP1 haplotypes with amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014 Mar;15(1-2):130-7.

Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D, O'Donnell H, et al. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med.* 2000 Oct 1;29(7):652–8.

Boll M-C, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Murillo-Bonilla L, Rios C. Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochemical Research.* 2003;28(5):699–703.

Bonnefont-Rousselot D, Lacomblez L, Jaudon M, Lepage S, Salachas F, Bensimon G, et al. Blood oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2000 Sep 1;178(1):57–62.

Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ Jr, Sapp P, McKenna-Yasek D, Brown RH Jr, Hayward LJ. "Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules." *Hum Mol Genet* 2010, 19:4160–4175.

Bouligand J, Cabaret O, Canonico M, Verstuyft C, Dubert L, Becquemont L, Guiochon-Mantel A, Scarabin PY; Estrogen and Thromboembolism Risk (ESTHER) Study Group "Effect of NFE2L2 genetic polymorphism on the association between oral estrogen therapy and the risk of venous thromboembolism in postmenopausal women." *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Jan;89(1):60-4.

Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW, Cleveland DW “Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1.” *Science*. 1998 Sep 18;281(5384):1851-4.

Bunina TL. “On intracellular inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis.” *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 1962;62:1293–1299.

Buratti E, Baralle FE. The multiple roles of TDP-43 in pre-RNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol* 2010; 7: 420-9

Calvo A.C., Manzano R., Mendonça D.M., Muñoz M.J., Zaragoza P., Osta R. “Amyotrophic lateral sclerosis: a focus on disease progression.” *Biomed Res Int*. 2014;2014:925101.

Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. “Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables.” *Am J Clin Nutr*. 1998 Nov;68(5):1081-7.

Capeillère-Blandin C1, Gausson V, Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V “Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products.” *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jun 28;1689(2):91-102.

Carri MT, Valle C, Bozzo F, Cozzolino M. “Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS.” *Front Cell Neurosci*. 2015 Feb 17;9:41

Charcot JM. “Leçons sur les Maladies du Système Nerveux Faites a la Salpetriere par JM Charcot.” *Bureaux du Progrès Médical*.1883

Chen S., Sayana P, Zhang X, Le W. “Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update.” *Mol Neurodegener*. 2013 Aug 13;8:28

Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*. 2005;128(Pt 3):472–476.

Chiò A., Logroscino G., Traynor B.J., “Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature” *Neuroepidemiology*, 41 (2013), pp. 118–130

Cho HY, Marzec J, Kleeberger SR “Functional polymorphisms in NRF2: Implications for Human disease.” *Free Radic Biol Med*. 2015 Jun 24. pii: S0891-5849(15)00280-4

Choi J., Rees H.D., Weintraub S.T., Levey A.I., Chin L.S., Li L., “Oxidative modifications and aggregation of Cu/Zn superoxide dismutase associated with Alzheimer’s and Parkinson’s diseases”, *J. Biol. Chem*. 280 (2005) 11648–11655.

Cluskey S, Ramsden DB. “Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis.” *Mol Pathol* 2001.

Cohen TJ, Hwang AW, Unger T, Trojanowski JQ, Lee VM “Redox signalling directly regulates TDP-43 via cysteine oxidation and disulphide cross-linking.” *EMBO J*. 2012 Mar 7;31(5):1241-52.

Corcia P, Valdmanis P, Millecamps S, Lionnet C, Blasco H, Mouzat K, Daoud H, Belzil V, Morales R, Pageot N, Danel-Brunaud V, Vandenberghe N, Pradat PF, Couratier P, Salachas F, Lumbroso S, Rouleau GA, Meininger V, Camu W “Phenotype and genotype analysis in amyotrophic lateral sclerosis with TARDBP gene mutations.” *Neurology*. 2012 May 8;78(19):1519-26.

Corona JC, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. “Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis.” *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Nov;11(11):1415-28.

Cova E, Cereda C, Galli A, Curti D, Finotti C, Di Poto C, Corato M, Mazzini G, Ceroni M. “Modified expression of Bcl-2 and SOD1 proteins in lymphocytes from sporadic ALS patients.” *Neurosci Lett*. 2006 May 22;399(3):186-90.

Cozzolino M, Carri MT. “Mitochondrial dysfunction in ALS.” *Prog Neurobiol*. 2012 May;97(2):54-66.

Cozzolino M., Ferri A., Carri M.T. “Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications.” *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:405–443.

Cozzolino M., Rossi S., Mirra A., Carri M.T. “Mitochondrial dynamism and the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis.” *Front Cell Neurosci*. 2015; 9: 31.

Da Cruz S., Cleveland D.W. “Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond.” *Curr Opin Neurobiol* 2011; 21: 904-19.

D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. “Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.” *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:509-27

Daoud H., Rouleau G.A. “Motor neuron disease: a role for ubiquilin 2 mutations in neurodegeneration.” *Nat Rev Neurol* 2011, 7:599–600.

Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. “Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease.” *Free Radic Biol Med*. 1999 Dec;27(11-12):1151-63

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, J Adamson, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R “Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis” *Neuron*. 2011 Oct 20; 72 (2): 245-56

Deng H.X., Chen W., Hong S.T. “Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia” *Nature*, 477, pp. 211–215. 2011

Deng H.X., Hentati A., Tainer J.A., Iqbal Z., Cayabyab A., Hung W.Y., Getzoff E.D., Hu P., Herzfeldt B., Roos R.P. “Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase.” *Science*. 1993 Aug 20;261(5124):1047-51.

Dinkova-Kostova A.T., Kostov R.V. “Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease” *Trends Mol. Med.* 18(2012)337–347.

Dinkova-Kostova Albena T., Baird Liam, Holmström Kira M., Meyer Colin J. and Abramov Andrey Y. “The spatiotemporal regulation of the Keap1–Nrf2 pathway and its importance in cellular bioenergetics” *Biochem Soc Trans.* 2015 Aug 1; 43(4): 602–610.

Dinkova-Kostova AT, Abramov AY “The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function.” *Free Radic Biol Med.* 2015 May 11. S0891-5849(15)00212-9.

Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IR, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C. “ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt transportin-mediated nuclear import.” *EMBO J* 2010, 29:2841–2857.

Dumont M, Wille E, Calingasan NY, Tampellini D, Williams C, Gouras GK, et al. “Triterpenoid CDDO-methylamide improves memory and decreases amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease.” *J Neurochem* 2009;109:502–12.

Eftekharzadeh B, Maghsoudi N, Khodaghali F. “Stabilization of transcription factor Nrf2 by tBHQ prevents oxidative stress-induced amyloid beta formation in NT2N neurons.” *Biochimie* 2010;92:245–53.

Ellman GL. “Tissue sulfhydryl groups.” *Arch Biochem Biophys.* 1959 May;82(1):70-7.

Emerit J, Edeas M, Bricaire F. “Neurodegenerative diseases and oxidative stress.” *Biomed Pharmacother.* 2004 Jan;58(1):39-46

Espinosa-Diez Cristina, Verónica Miguel,^a Daniela Mennerich,^b Thomas Kietzmann,^b Patricia Sánchez-Pérez,^c Susana Cadenas,^{a,c} and Santiago Lamasa, “Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress” *Redox Biol.* 2015 Dec; 6: 183–197.

Esterbauer H, Cheeseman KH. “Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal.” *Methods Enzymol.* 1990;186:407-21.

Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RA, Levina V, Halloran MA, Gleeson PA, Blair IP, Soo KY, King AE, Atkin JD. “C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking.” *Hum Mol Genet.* 2014 Jul 1;23(13):3579-95

Ferrali M, Fulceri R, Benedetti A, Comporti M. “Effects of carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids on various microsomal enzyme activities of the liver.” *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1980 Oct;30(1):99-112

Finsterer J. “Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise.” *BMC Musculoskelet Disord.* 2012;13:218.

Franzini M, Fornaciari I, Siciliano G, Volpi L, Ricci G, Marchi S, Gagliardi G, Baggiani A, Torracca F, Fierabracci V, Miccoli M, Pompella A, Emdin M, Paolicchi A. Serum gamma-

glutamyltransferase fractions in myotonic dystrophy type I: differences with healthy subjects and patients with liver disease. *Clin Biochem.* 2010;43(15):1246-8.

Fray AE, Ince PG, Banner SJ, Milton ID, Usher PA, Cookson MR, et al. "The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study." *Eur J Neurosci.* 1998;10:2481

Fu S, Wang H, Davies M, Dean R. "Reactions of hypochlorous acid with tyrosine and peptidyl-tyrosyl residues give dichlorinated and aldehydic products in addition to 3-chlorotyrosine." *J Biol Chem.* 2000;275(15):10851-8.

Furukawa, M.; Xiong, Y. "BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase." *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25, 162–171.

Gabby M, Tauber M, Porat S, Simantov R. "Selective role of glutathione in protecting human neuronal cells from dopamine-induced apoptosis." *Neuropharmacology.* 1996 May;35(5):571-8.

Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. "Mitochondria: master regulators of danger signalling." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13:780–788

Gao Y., Chu S.F., Li J.P., Zhang Z., Yan J.Q., Wen Z.L, Xia C.Y., Mou Z., Wang Z.Z., He W.B., Guo X.F., Wei G.N., Chen N.H., "Protopanaxatriol protects against 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in a rat model of Huntington's disease", *Acta Pharmacol Sin* 36 (2015) 311–322.

Ghosh D., Levault K. R. and G. J. Brewer, "Dual-energy precursor and nuclear erythroid-related factor 2 activator treatment additively improve redox glutathione levels and neuron survival in aging and Alzheimer mouse neurons upstream of reactive oxygen species," *Neurobiology of Aging*, vol. 4580, no. 13, pp. 00284-4, 2013.

Gijssels I, Van Langenhove T, van der Zee J, "C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study." *Lancet Neurol.* 2012;11(1):54–65.

Gordon PH, Mehal JM, Holman RC, Rowland LP, Rowland AS, Cheek JE "Incidence of amyotrophic lateral sclerosis among American Indians and Alaska natives." *JAMA Neurol.* 2013

GTEx Consortium. "Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans." *Science.* 2015 May 8;348(6235):648-60.

Guareschi S, Cova E, Cereda C, Ceroni M, Donetti E, Bosco DA, Trotti D, Pasinelli P "An over-oxidized form of superoxide dismutase found in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with bulbar onset shares a toxic mechanism with mutant SOD1." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 27;109(13):5074-9.

Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL. "Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice." *Hum Mol Genet.* 2003 Oct 1;12(19):2519-32.

Gurney M.E. “The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies.” *J. Neurol. Sci* 1997; 152: S67-S73

Gurney M.E., Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD. “Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation.” *Science*. 1994; 264 :1772.

Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE “A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2.” *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):166-73

Haeusler AR, Donnelly CJ, Periz G, Simko EA, Shaw PG, Kim MS, Maragakis NJ, Troncoso JC, Pandey A, Sattler R, Rothstein JD, Wang J. “C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease.” *Nature*. 2014 Mar 13;507(7491):195-200

Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song SW, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao MH, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AHM, Kaspar BK. “Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons.” *Nature Biotechnology*. 2011;29(9):824–U79

Halliwell B, Gutteridge JM. “The definition and measurement of antioxidants in biological systems.” *Free Radic Biol Med*. 1995 Jan;18(1):125-6

Halliwell B, Whiteman M “Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?” *Br J Pharmacol*. 2004 May; 142(2): 231–255

Harikrishnareddy D, Misra S, Upadhyay S, Modi M, Medhi B. “Roots to start research in amyotrophic lateral sclerosis: molecular pathways and novel therapeutics for future.” *Rev Neurosci*. 2015;26(2):161-81.

Hartikainen J.M., Tengstrom M., Kosma V.M., Kinnula V.L., Mannermaa A., “Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer” *CancerRes*72(2012) 5537–5546.

Haug C, Zhou H et al. “FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration.” *Plos Genet* 2011; 7: e100

Hawkins CL, Davies MJ “Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation.” *Biochem J*. 1998 Jun 15;332 (Pt 3):617-25.

Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. “Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS.” *J Neurosci*. 2002 Mar 15;22(6):RC215

- Hitchler M.J., Domann F.E. "Regulation of CuZnSOD and its redox signaling potential: implications for amyotrophic lateral sclerosis." *Antioxid Redox Signal*. 2014 Apr 1;20(10):1590-8.
- Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*. 1994;233:380-5.
- Hua CC, Chang LC, Tseng JC, Chu CM, Liu YC, Shieh WB. Functional haplotypes in the promoter region of transcription factor NRF2 in chronic obstructive pulmonary disease. *Disease Markers*. 2010;28(3):185–193.
- Huang D, Ou B, Prior RL. "The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005 Mar 23;53(6):1841-56
- Huang H, Nguyen T, Pickett C. "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." *J Biol Chem*. 2002;277:42769–42774.
- Hyberston BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation." *Mol Aspects Med*. 2011 Aug;32(4-6):234-46.
- Ilzecka J. "Prostaglandin E2 is increased in amyotrophic lateral sclerosis patients." *Acta Neurologica Scandinavica*. 2003;108(2):125–129.
- Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. "Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis." *Clin Epidemiol*. 2015 Feb 12;7:181-93.
- Irwin D, Lippa C, Swearer J "Cognition and amyotrophic lateral sclerosis (ALS)" *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2007 Aug-Sep;22(4):300-12.
- Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW. "Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS." *Neuron*. 2010 Aug 26;67(4):575-87
- Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M "Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins." *Mol Cell Biol*. 1995 Aug;15(8):4184-93.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." *Genes Dev*. 1999 Jan 1;13(1):76-86
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. "Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles." *Genes Cells*. 2003 Apr;8(4):379-91
- Iwata M, Hirano A "Sparing of the Onufrowicz nucleus in sacral anterior horn lesions." *Ann Neurol*. 1978 Sep;4(3):245-9.

Izawa S, Inoue Y, Kimura A. "Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem J*. 1996 Nov 15;320 (Pt 1):61-7.

Jacobsson J, Jonsson PA, Andersen PM, Forsgren L, Marklund SL. "Superoxide dismutase in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients with and without CuZn-superoxide dismutase mutations." *Brain*. 2001 Jul;124(Pt 7):1461-6.

Johnson DA, Johnson JA. "Nrf2-a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases." *Free Radic Biol Med*. 2015 Aug 14. S0891-5849(15)00471-2.

Johnson JA. "The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis." *Toxicol Sci* 2010;114:237–46 (a).

Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wu J, Ding J, McCluskey L, Martinez-Lage M, Falcone D, Hernandez DG, Arepalli S, Chong S, Schymick JC, Rothstein J, Landi F, Wang YD, Calvo A, Mora G, Sabatelli M, Monsurrò MR, Battistini S, Salvi F, Spataro R, Sola P, Borghero G, Consortium ITALSGEN, Galassi G, Scholz SW, Taylor JP, Restagno G, Chiò A, Traynor BJ "Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS." *Neuron* 2010, 68:857–864 (b)

Kabuta C, Kono K, Wada K, Kabuta T. 4-Hydroxynonenal induces persistent insolubilization of TDP-43 and alters its intracellular localization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;463(1-2):82-7.

Kanekura K, Hashimoto Y, Niikura T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I "Alsin, the product of ALS2 gene, suppresses SOD1 mutant neurotoxicity through RhoGEF domain by interacting with SOD1 mutants." *J Biol Chem* 2004, 279:19247–19256

Kang, M.I.; Kobayashi, A.; Wakabayashi, N.; Kim, S.G.; Yamamoto, M. "Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 2046–2051.

Kanno T, Tanaka K, Yanagisawa Y, Yasutake K, Hadano S, Yoshii F, Hirayama N, Ikeda JE "A novel small molecule, N-(4-(2-pyridyl)(1,3-thiazol-2-yl))-2-(2,4,6-trimethylphenoxy) acetamide, selectively protects against oxidative stress-induced cell death by activating the Nrf2-ARE pathway: therapeutic implications for ALS." *Free Radic Biol Med*. 2012 Dec 1;53(11):2028-42.

Kasarskis EJ, Lindquist JH, Coffman CJ, Grambow SC, Feussner JR, Allen KD, Oddone EZ, Kamins KA, Horner RD; Als Gulf War Clinical Review Team. "Clinical aspects of ALS in Gulf War veterans." *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 Feb;10(1):35-41

Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M "Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription." *Genes Cells*. 2001 Oct;6(10):857-68.

Kaufmann E, Boehm BO, Sussmuth SD, Kientsch-Engel R, Sperfeld A, Ludolph AC, "The advanced glycation end-product N epsilon-(carboxymethyl)lysine level is elevated in

cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis.” *Neurosci Lett*. 2004 Nov 23;371(2–3):226–9.

Keizman D, Ish-Shalom M, Berliner S, Maimon N, Vered Y, Artamonov I, Tsechori J, Nefussy B, Drory VE. Low uric acid levels in serum of patients with ALS: further evidence for oxidative stress? *J Neurol Sci*. 2009;285(1-2):95-9.

Keum YS, Choi BY “Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway.” *Molecules*. 2014 Jul 10;19(7):10074-89.

Khin Khin Eindra, Minor Darlinda, Holloway Amanda and Pelleg Ayla “Decisional Capacity in Amyotrophic Lateral Sclerosis” *J Am Acad Psychiatry Law*(June 2015) 43:2:210-217

Kim HV, Kim HY, Ehrlich HY, Choi SY, Kim DJ, Kim Y. “Amelioration of Alzheimer’s disease by neuroprotective effect of sulforaphane in animal model.” *Amyloid* 2013;20:7–12.

Kohen R, Nyska A “Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification.” *Toxicol Pathol*. 2002 Nov-Dec;30(6):620-50.

Koichi Okamoto YM, Yukio Fujita. “Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis.” *Neuropathology*. 2008;28:109–115.

Kokić AN, Stević Z, Stojanović S, Blagojević DP, Jones DR, Pavlović S, Niketić V, Apostolski S, Spasić MB “Biotransformation of nitric oxide in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients.” *Redox Rep*. 2005;10(5):265-70.

Korac J, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, Terzic J, Dikic I “Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates.” *J Cell Sci* 2013, 126:580–592.

Koracevic D1, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V “Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids.” *J Clin Pathol*. 2001 May;54(5):356-61.

Kundu JK, Surh YJ. “Inflammation: gearing the journey to cancer.” *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug;659(1-2):15-30.

Lanson NA Jr, Pandey UB. “FUS-related proteinopathies: lessons from animal models.” *Brain Res* 2012; 1462: 3-15

Leblond CS, Kaneb HM, Dion PA, Rouleau GA. “Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis.” *Exp Neurol*. 2014 Dec;262 Pt B:91-101.

Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA. “Nrf2, a multi-organ protector?” *FASEB J*. 2005 Jul;19(9):1061-6.

Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin JE, Gallo JM, Weller RO, Anderton BH. “Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis.” *Morphology, distribution, and specificity. Brain*. 1991;114:775–788

- Li J, O W, Li W, Jiang ZG1, Ghanbari HA. "Oxidative stress and neurodegenerative disorders." *Int J Mol Sci*. 2013 Dec 16;14(12):24438-75.
- Li W, Kong AN "Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response." *Mol Carcinog*. 2009 Feb;48(2):91-104.
- Liu N, Kan QC, Zhang XJ, Xv YM, Zhang S, Zhang GX, Zhu L. "Upregulation of immunomodulatory molecules by matrine treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Exp Mol Pathol*. 2014 Dec;97(3):470-6.
- Lodge D, Davies SN, Jones MG, Millar J, Manallack DT, Ornstein PL, Verberne AJ, Young N, Beart PM "A comparison between the in vivo and in vitro activity of five potent and competitive NMDA antagonists." *Br J Pharmacol*. 1988 Nov;95(3):957-65
- Logroschino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E; EURALS. "Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Apr;81(4):385-90. doi: 10.1136/jnnp.2009.183525. Epub 2009 Aug 25.
- Lou H, Jing X, Wei X, Shi H, Ren D, Zhang X. "Naringenin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway." *Neuropharmacology* 2014;79:380–8.
- Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. "TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia." *Lancet Neurol*. 2010;9(10):995–1007.
- Maier A, Holm T, Wicks P, Steinfurth L, Linke P, Münch C, Meyer R, Meyer T. "Online assessment of ALS functional rating scale compares well to in-clinic evaluation: a prospective trial." *Amyotroph Lateral Scler*. 2012 Feb;13(2):210-6.
- Manjaly ZR, Scott KM et al. "The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: a population based study." *Amyotroph. Lateral Scler*. 2010
- Maragakis NJ, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD "Altered expression of the glutamate transporter EAAT2b in neurological disease." *Ann Neurol*. 2004 Apr;55(4):469-77.
- Marczak, E.D., et al., "Polymorphisms in the transcription factor NRF2 and forearm vasodilator responses in humans." *Pharmacogenet Genomics*, 2012. 22(8): p. 620-8.
- Marin B., Hamidou B, Couratier P, Nicol M, Delzor A, Raymondeau M, Druet-Cabanac M, Lautrette G, Boumediene F, Preux PM "Population-based epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in an ageing Europe--the French register of ALS in Limousin (FRALim register)". *Eur J Neurol*. 2014
- Martin L.J. "Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases." *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 2012;107:355–415
- Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lancken PN, Aplenc R, Yamamoto T, Yamamoto M, Cho HY, et al. "Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury." *FASEB J* (2007) 21:2237–2246.

Massimalany C, Gangaplara A, “Copper-zinc superoxide dismutase deficient mice show increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein” 35- 55. *J. Neuroimmunol* 2013; 256: 19-27

Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, et al. Lower FEV1 in non-COPD, nonasthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV1, total IgE levels, and TSLP genotypes. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2011;6:181–189.

McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD “Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression.” *J Biol Chem*. 2003 Jun 13;278(24):21592-600

McMahon M., Thomas, N.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J.D. “Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron.” *J. Biol. Chem*. 2004, 279, 31556–31567

Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J., “Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress” *Free Rad. Biol. Med.* 17 (1994) 235–248.

Millecamps S, Salachas F, Cazeneuve C, Gordon P, Bricka B, Camuzat A, Guillot-Noël L, Russaouen O, Bruneteau G, Pradat PF, Le Forestier N, Vandenberghe N, Danel-Brunaud V, Guy N, Thauvin-Robinet C, Lacomblez L, Couratier P, Hannequin D, Seilhean D, Le Ber I, Corcia P, Camu W, Brice A, Rouleau G, LeGuern E, Meininger V “SOD1, ANG, VAPB, TARDBP, and FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis: genotype-phenotype correlations.” *J Med Genet*. 2010 Aug; 47(8):554-60

Mitchell P., Moyle J. “Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation.” *Nature*. 1967;213:137–139

Mitsumoto H, Santella RM, Liu X, Bogdanov M, Zipprich J, Wu HC, Mahata J, Kilty M, Bednarz K, Bell D, Gordon PH, Hornig M, Mehrazin M, Naini A, Flint Beal M, Factor-Litvak P. “Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS.” *Amyotroph Lateral Scler*. 2008 Jun;9(3):177-83.

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K. “Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis.” *Acta Neuropathologica*. 2006;112:597–603.

Mohler J, Vani K, Leung S, Epstein A “Segmentally restricted, cephalic expression of a leucine zipper gene during *Drosophila* embryogenesis.” *Mech Dev*. 1991 Mar;34(1):3-9.

Moi P., Chan K, Asunis I, Cao A, Kan Y W “Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 October 11; 91(21): 9926–9930.

Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ 2nd “Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress.” *FASEB J*. 2004 Dec;18(15):1791-800. Review

Morrow JD “Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans.” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Feb;25(2):279-86

Motohashi H, Yamamoto M. "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism." *Trends Mol Med*. 2004 Nov;10(11):549-57.

Murmu RP, Martin E, Rastetter A, Esteves T, Muriel MP, El Hachimi KH, Denora PS, Dauphin A, Fernandez JC, Duyckaerts C, Brice A, Darios F, Stevanin G: "Cellular distribution and subcellular localization of spatacsin and spastizin, two proteins involved in hereditary spastic paraplegia." *Mol Cell Neurosci* 2011, 47:191–202

Nalbandian A, Nguyen C, Katheria V, Llewellyn KJ, Badadani M, Caiozzo V, Kimonis VE. "Exercise training reverses skeletal muscle atrophy in an experimental model of VCP disease." *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10):e76187.

Neumann M, Roeber S et al. "Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease." *Acta Neuropathol*. 2009;118: 605-616

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, et al. "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis." *Science*. 2006;314:130–133

Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB "Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome." *J Biol Chem*. 2003 Feb 14;278(7):4536-41

Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. "The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress." *Free Radic Biol Med*. 2004 Aug 15;37(4):433-41.

Niccoli T, Partridge L. "Ageing as a risk factor for disease." *Curr Biol*. 2012 Sep 11;22(17):R741-52.

Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, Filip M. "Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases." *Mol Neurobiol*. 2015 Jul 22

Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD "Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence." *Biochem J*. 2003 Sep 1;374(Pt 2):337-48.

Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB "The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation." *Mol Cell Biol*. 2005 Dec;25(24):10895-906.

Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK "Regulation of Nrf2-an update." *Free Radic Biol Med*. 2014 Jan;66:36-44.

Noyan T, Güler A, Sekeroğlu MR, Kamaci M. "Serum advanced oxidation protein products, myeloperoxidase and ascorbic acid in pre-eclampsia and eclampsia." *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2006 Dec;46(6):486-91.

Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA "Extracellular superoxide dismutase." *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Dec;37(12):2466-71.

Okado-Matsumoto A, Fridovich I. "Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):9010-4.

Olney JW, de Gubareff T. "Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea." *Nature*. 1978 Feb 9;271(5645):557-9.

Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S, Munhoz RP, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH, Bernardi G, Kawarai T. "SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis." *Brain*. 2010 Feb;133(Pt 2):591-8.

Osburn WO, Kensler TW. "Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults." *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug;659(1-2):31-9

Padhi AK, Kumar H, Vasaikar SV, Jayaram B, Gomes J: "Mechanisms of loss of functions of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis." *PLoS One* 2012, 7:e32479

Parakh S, Spencer DM, Halloran MA, Soo KY, Atkin JD "Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis." *Oxidat Med Cell Longevity*2013

Pareek TK, Belkadi A, Kesavapany S, Zaremba A, Loh SL, Bai L, et al. "Triterpenoid modulation of IL-17 and Nrf-2 expression ameliorates neuroinflammation and promotes remyelination in autoimmune encephalomyelitis." *Sci Rep* 2011;1:201.

Pasinelli P, Brown RH. "Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics." *Nat Rev Neurosci* 2006, 7:710–723.

Petri S, Körner S, Kiaei M. "Nrf2/ARE Signaling Pathway: Key Mediator in Oxidative Stress and Potential Therapeutic Target in ALS." *Neurol Res Int*. 2012;2012:878030.

Piao YS, Wakabayashi K, Kakita A, Yamada M, Hayashi S, Morita T, Ikuta F, Oyanagi K, Takahashi H. Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain Pathol*. 2003;13:10–22.

Plafker, K.S.; Nguyen, L.; Barneche, M.; Mirza, S.; Crawford, D.; Plafker, S.M. "The ubiquitin-conjugating enzyme UbcM2 can regulate the stability and activity of the antioxidant transcription factor Nrf2." *J. Biol. Chem*. 2010, 285, 23064–23074.

Qiu L, Qiao T, Beers M, Tan W, Wang H, Yang B, Xu Z: Widespread aggregation of mutant VAPB associated with ALS does not cause motor neuron degeneration or modulate mutant SOD1 aggregation and toxicity in mice. *Mol Neurodegener* 2013, 8:1.

Rada P, Rojo AI, Evrard-Todeschi N, Innamorato NG, Cotte A, Jaworski T, et al. "Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/beta-TrCP axis." *Mol Cell Biol* 2012;32:3486–99..

Rao SD, Weiss JH. "Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis." *Trends Neurosci*. 2004 Jan;27(1):17-23. Review

Ravits J, Appel S, Baloh RH, Barohn R, Brooks BR, Elman L, Floeter MK, Henderson C, Lomen-Hoerth C, Macklis JD, McCluskey L, Mitsumoto H, Przedborski S, Rothstein J, Trojanowski JQ, van den Berg LH, Ringel S Johnson DA, Amirahmadi S, Ward C, Fabry Z, “Deciphering amyotrophic lateral sclerosis: what phenotype, neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis.” *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2013 May;14 Suppl 1:5-18.

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF. “Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury”. *Nat Genet.* 1996; 13 :43

Redler RL, Dokholyan NV “The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS).” *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;107:215-62.

Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. “A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD.” *Neuron.* 2011;72(2):257–268.

Robberecht W. “Genetics of amyotrophic lateral sclerosis.” *J Neurol.* 2000 Dec;247 Suppl 6:VI/2-6.

Roberts LJ, Morrow JD. “Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo.” *Free Radic Biol Med.* 2000 Feb 15;28(4):505-13.

Rodonev N. Roman “Urate as an endogenous antioxidant. *Free Radical in Biology and Medicine.*” 2003;77:222.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al “Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.” *Nature.* 1993 Mar 4;362(6415):59-62.

Rothstein JD “Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis.” *Ann Neurol.* 2009 Jan;65 Suppl 1:S3-9.

Rothstein JD. “Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis.” *Adv Neurol.* 1995;68:7-20; discussion 21-7. Review.

Rowland LP, Shneider NA. “Amyotrophic lateral sclerosis.” *N Engl J Med.* 2001 May 31;344(22):1688-700. Review

Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. “The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity.” *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266(18):11632-9.

Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, et al. “Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis.” *PLoS Genet.* 2008;4(9):e1000193

Sambrook, J., Russell, D. “Molecular Cloning: a Laboratory Manual”, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Sandstrom et al., 1994; (2001).

Sarlette A., Krampfl K., Grothe C., Neuhoff N., Dengler R., Petri S., “Nuclear erythroid 2-related factor2- antioxidative response element signaling pathway in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis” *J Neuropathol Exp Neurol* 67(2008)1055–1062.

Sasaki S, Komori T, Iwata M. “Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis.” *Acta Neuropathol.* 2000;100:138

Sasaki S, Tsutsumi Y, Yamane K, Sakuma H, Maruyama S. “Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with extensive neurological involvement.” *Acta Neuropathol.* 1992;84(2):211-5

Satoh T., McKercher S. R., and S.A. Lipton, “Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 65C, pp. 645-657, 2013.

Sena L.A., Chandel N.S. “Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species.” *Mol. Cell.* 2012;48:158–167

Shaheen SO, Newson RB, Ring SM, Rose-Zerilli MJ, Holloway JW, Henderson AJ. “Prenatal and infant acetaminophen exposure, antioxidant gene polymorphisms, and childhood asthma.” *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Dec;126(6):1141-8.e7.

Shaw PJ “Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease.” *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Aug;76(8):1046-57.

Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH. “Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress.” *J Neurosci.* 2003 Apr 15;23(8):3394-406

Shimoyama Y, Mitsuda Y., Tsuruta Y., Hamajima N., Niwa T., “Polymorphism of Nrf2, anantioxidative gene, is associated with blood pressure and cardiovascular mortality in hemodialysis patients” *International journal of medical sciences* 11(2014)726–731.

Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S, Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, Takahashi R, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M “Aberrant assembly of RNA recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43).” *J Biol Chem.* 2013 May 24;288(21):14886-905.

Siciliano G., Piazza S., Carlesi C. et al., “Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis,” *Journal of Neurology*, vol. 254, no. 5, pp. 575-580, 2007.

Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau G, Jeffers AJ, Sapp P, Hung WY, Bebout J, McKenna-Yasek D, et al. “Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity.” *N Engl J Med.* 1991 May 16;324(20):1381-4.

Siddique T, Pericak-Vance MA, Brooks BR, Roos RP, Hung WY, Antel JP, Munsat TL, Phillips K, Warner K, Speer M, et al “Linkage analysis in familial amyotrophic lateral sclerosis.” *Neurology.* 1989 Jul;39(7):919-25.

Siebert A, Desai V, Chandrasekaran K, Fiskum G, Jafri MS. “Nrf2 activators provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in rat organotypic nigrostriatal cocultures”. *J Neurosci Res* 2009;87:1659–69.

Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, Smith RG, Appel SH. “Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden.” *Neurology*. 2004;62(10):1758–1765.

Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ, Gromak N: “Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination.” *Mol Cell* 2011, 42:794–805.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. “TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.” *Science*. 2008;319:1668–1672.

Stack C, Ho D, Wille E, Calingasan NY, Williams C, Liby K, et al. “Triterpenoids CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington’s disease.” *Free Radic Biol Med* 2010;49:147–58.

Stoica R, De Vos KJ, Paillusson S, Mueller S, Sancho RM, Lau KF, Vizcay-Barrena G Lin WL, Xu YF, Lewis J6, Dickson DW, Petrucelli L, Mitchell JC, Shaw CE, Miller CC “ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43.” *Nat Commun*. 2014 Jun 3;5:3996.

Struzyńska L. “A glutamatergic component of lead toxicity in adult brain: the role of astrocytic glutamate transporters.” *Neurochem Int*. 2009 Jul-Aug;55(1-3):151-6.

Suzuki T., Motohashi H., Yamamoto M. “Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway” *Trends Pharmacol. Sci*. 34 (2013) 340–346.

Sykiotis, G.P.; Bohmann, D. “Stress-activated cap’n’collar transcription factors in aging and human disease.” *Sci. Signal*. 2010

Sykiotis, G.P.; Habeos, I.G.; Samuelson, A.V.; Bohmann, D. “The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation.” *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2011, 14, 41–48.

Tadic V, Prell T, Lautenschlaeger J, Grosskreutz J. “The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis.” *Front Cell Neurosci*. 2014 May 30;8:147.

Tait S.W., Green D.R. “Mitochondria and cell signaling”. *J. Cell Sci*. 2012;125:807–815

Takaya K., Suzuki T., Motohashi H., Onodera K., Satomi S., Kensler T.W., Yamamoto “Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system” *Free Radic. Biol. Med*. 53 (2012) 817–827.

Tan W, Pasinelli P, Trotti D. “Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis.” *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1842(8):1295-301.

Tanaka K, Kanno T, Yanagisawa Y, Yasutake K, Inoue S, Hirayama N, Ikeda JE. “A novel acylaminoimidazole derivative, WN1316, alleviates disease progression via suppression of glial inflammation in ALS mouse model.” *PLoS One*. 2014 Jan 31;9(1):e87728.

Tanji K., Maruyama A., Odagiri S., Mori F., Itoh K., Kakita A., Takahashi H., Wakabayashi K., “Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases” *J Neuropathol Exp Neurol* 72 (2013)18–28.

Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. “Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations.” *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Mar;286(3):R431-44.

Tuncel D, Aydin N, Aribal Kocatürk P, Ozelçi Kavas G, Sarikaya S. “Red cell superoxide dismutase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.” *J Clin Neurosci*. 2006 Dec;13(10):991-4.

Turner MR, Bowser R, Bruijn L, Dupuis L, Ludolph A, McGrath M, Manfredi G, Maragakis N, Miller RG, Pullman SL, Rutkove SB, Shaw PJ, Shefner J, Fischbeck KH. “Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis.” *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013 May;14 Suppl 1:19-32.

Turner MR, Kiernan MC, Leigh PN, Talbot K. “Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis.” *Lancet Neurol*. 2009;8:94–109.

Turner MR, Kiernan MC. “Does interneuronal dysfunction contribute to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis?” *Amyotroph Lateral Scler*. 2012 May;13(3):245-5

Turner MR, Scaber J, Goodfellow JA, Lord ME, Marsden R, Talbot K “The diagnostic pathway and prognosis in bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis.” *J Neurol Sci*. 2010 Jul 15;294(1-2):81-5.

Uccelli R, Binazzi A, Altavista P, Belli S, Comba P, Mastrantonio M, Vanacore N. “Geographic distribution of amyotrophic lateral sclerosis through motor neuron disease mortality data.” *Eur J Epidemiol*. *Eur J Epidemiol*. 2007

Uruno, A.; Motohashi, H. “The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles.” *Nitric Oxide* 2011, 25, 153–160.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options.” *Curr Neuropharmacol*. 2009 Mar;7(1):65-74.

Valetdinova K. R., S. P. Medvedev, S. M. Zakian; “Model Systems of Motor Neuron Diseases As a Platform for Studying Pathogenic Mechanisms and Searching for Therapeutic Agents” *Acta Naturae*. 2015

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.” *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.

- Vance C, Rogelj B et al. "Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6." *Science* 2009; 323: 1208-1211
- Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA."Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurosci.* 2008 Dec 10;28(50):13574-81.
- Vargas MR, Pehar M, Cassina P, et al. "Fibroblast growth factor-1 induces heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid 2Yrelated factor 2 (Nrf2) in spinal cord astrocytes: Consequences for motor neuron survival." *J Biol Chem* 2005;280:25571Y79
- Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz WS "Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Brain.* 2000 Jul;123 (Pt 7):1339-48.
- Vlassara H. "Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products." *J Lab Clin Med.* 1994 Jul;124(1):19-30
- Von Otter M, Bergström P, Quattrone A, De Marco EV, Annesi G, Söderkvist P, Wettinger SB, Drozdziak M, Bialecka M, Nissbrandt H, Klein C, Nilsson M, Hammarsten O, Nilsson S, Zetterberg H. "Genetic associations of Nrf2-encoding NFE2L2 variants with Parkinson's disease - a multicenter study." *BMC Med Genet.* 2014 Dec 12;15:131.
- Von Otter M., S. Landgren, S. Nilsson et al., "Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease," *BMC Medical Genetics*, vol. 11, p. 36, 2010.
- Wakabayashi N, Dinkova-Kostova A, Holtzclaw W, Kang M, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler T, Talalay P. "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2040–2045.
- Wallace D.C. "Mitochondria and cancer." *Nat. Rev. Cancer.* 2012;12:685–698
- Wang, H.; Liu, K.; Geng, M.; Gao, P.; Wu, X.; Hai, Y.; Li, Y.; Li, Y.; Luo, L.; Hayes, J.D.; et al. "Rxralpha inhibits the Nrf2-are signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of Nrf2." *Cancer Res.* 2013, 73, 3097–3108.
- Weiduschat N, Mao X, Hupf J, Armstrong N, Kang G, Lange DJ, Mitsumoto H, Shungu DC. "Motor cortex glutathione deficit in ALS measured in vivo with the J-editing technique." *Neurosci Lett.* 2014 Jun 6;570:102-7.
- Wijesekera LC, Leigh PN "Amyotrophic lateral sclerosis." *Orphanet J Rare Dis.* 2009 Feb 3;4:3.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13.
- Witko-Sarsat V, Nguyen Khoa T, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1998;28:321-41. Wong e Holzbaaur, 2014

Wu T., Zhao F., Gao B., Tan C., Yagishita N., Nakajima T., Wong P.K., Chapman E., Fang D., Zhang D.D. “Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis” *Genes Dev.*, 28 (2014), pp. 708–722

Xiao S, McLean J, Robertson J. “Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question.” *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov-Dec;1762(11-12):1001-12.

Yamamoto T., Suzuki T., A. Kobayashi, J. Wakabayashi, J. Maher, H. Motohashi, M. Yamamoto, “Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity”, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 2758–2770.

Yang Y, Jiang S, Yan J, Li Y, Xin Z, Lin Y, Qu Y. “An overview of the molecular mechanisms and novel roles of Nrf2 in neurodegenerative disorders.” *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Feb;26(1):47-57

Yoshino H, Kimura A. “Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study)” *Amyotroph Lateral Scler.* 2006 Dec;7(4):241–5.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. “Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression.” *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug 1;33(3):337-49.

Zhang D.D., Hannink M., “Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress” *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 8137–8151.

Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. “Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex.” *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(24):10941-53

Zhang F, Wang W, “Miro1 deficiency in amyotrophic lateral sclerosis” *Front Aging Neurosci.* 2015

8. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione della mia tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni.

Un ringraziamento particolare va al Professor Siciliano per la disponibilità e la fiducia dimostratami nel corso di questo anno.

Desidero ringraziare i miei correlatori, il Professor Paolicchi ed il Professor Landi, per il loro supporto, la disponibilità dimostrata e i consigli dati per migliorare il mio lavoro di tesi.

Ringrazio, inoltre, la Dottoressa Lo Gerfo e la Dottoressa Petrozzi per la partecipazione alla stesura di questo lavoro, per la continua disponibilità a dirimere i miei dubbi e per la stima dimostratami.

Un sincero ringraziamento al Professor Coppedè, sempre pronto ad aiutarmi ed insegnarmi.

Ringrazio anche tutti i componenti del laboratorio di Neurobiologia clinica e Neurochimica della Clinica Neurologica, in modo particolare la Dottoressa Schirinzi e la Dottoressa Rocchi, i Tecnici di Laboratorio Baroni e Bacci, per l'affetto e la fiducia dimostratami durante la mia permanenza in laboratorio. Non meno importante, un enorme grazie alla Dottoressa Chico, per avermi sostenuta ed incoraggiata in ogni momento di bisogno.

Vorrei ringraziare la Signora Mela per la pazienza avuta ed i miei compagni di "viaggio", Alexia e Francesco, per aver allietato le ore di studio ed avermi spronata nei momenti difficili. Inoltre, ringrazio tutti i miei amici per avermi sempre confortato, in particolare Chiara e Serena che, seppur a distanza, mi sono state sempre vicine con lunghe telefonate.

Infine, ringrazio con tutto il cuore la mia famiglia, alla quale questa tesi è dedicata con tutto il mio affetto. Soprattutto alla mia mamma, che mi ha sempre incoraggiata e sostenuta nelle mie scelte e senza la quale non avrei mai raggiunto questo traguardo. Ringrazio il mio papà per avermi consolata e aver sempre creduto in me. Un grazie di cuore alla famiglia di Enrico per essermi stata sempre vicina. Per ultimo, ma non per importanza, ringrazio con immenso affetto Enrico che si è sempre preso cura di me in questi 6 anni, supportandomi e sopportandomi in ogni momento.