



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE

XX CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

ANALISI MOLECOLARE E FUNZIONALE
DELLA VARIABILITA' DEL GENE DELLA SUCCINICO
SEMIALDEIDE DEIDROGENASI (SSADH) UMANA

Francesca Palmerio

Docente Guida: Prof.ssa Patrizia Malaspina

Coordinatore: Prof. Gianni Cesareni

Indice

Summary.....	5
1 INTRODUZIONE	
<i>1.1 Le aldeide deidrogenasi nei vari organismi.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2 Le famiglie delle ALDH nell'uomo</i>	<i>11</i>
<i>1.2.1 Genetica delle ALDH.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.2 Ruolo detossificante nei confronti dell'HNE.....</i>	<i>16</i>
<i>1.3 L'enzima succinico semialdeide deidrogenasi nelle varie specie.....</i>	<i>19</i>
<i>1.4 La succinico semialdeide deidrogenasi (SSADH) umana.....</i>	<i>24</i>
<i>1.4.1 Analisi proteica.....</i>	<i>24</i>
<i>1.4.2 Identificazione e caratterizzazione strutturale del gene SSADH.....</i>	<i>24</i>
<i>1.4.3 5'UTR del gene SSADH.....</i>	<i>29</i>
<i>1.4.4 3'UTR del gene SSADH.....</i>	<i>29</i>
<i>1.5 La deficienza di succinico semialdeide deidrogenasi.....</i>	<i>33</i>
<i>1.5.1 Ruolo del GHB.....</i>	<i>36</i>
<i>1.5.2 Intervento terapeutico nella 4-HBA.....</i>	<i>39</i>
<i>1.5.3 Modello murino per la 4-HBA umana.....</i>	<i>39</i>
<i>1.5.4 Modello vegetale per la 4-HBA.....</i>	<i>41</i>
<i>1.6 Variabilità' patologica e non patologica del gene SSADH.....</i>	<i>42</i>
<i>1.6.1 Mutazioni patologiche identificate.....</i>	<i>42</i>
<i>1.6.2 Analisi popolazionistica e ruolo funzionale delle varianti polimorfiche della regionecodificante.....</i>	<i>44</i>
2 LO SCOPO DEL LAVORO.....	47
3 MATERIALI E METODI.....	49
<i>3.1 Creazione e caratterizzazione di costrutti per l'espressione in vitro del gene SSADH.....</i>	<i>49</i>

<i>Ricostruzione degli aplotipi della sequenza codificante.....</i>	49
<i>Vettori d'espressione per le varianti della regione codificante.....</i>	49
<i>Vettore d'espressione usato come controllo negativo.....</i>	49
<i>Vettori d'espressione per le varianti nella regione del promotore.....</i>	50
<i>Creazione di linee cellulari trasfettate in modo stabile e transiente.....</i>	50
<i>Estrazione dell'RNA e analisi del Northern blot delle linee cellulari stabili.....</i>	51
<i>Real-time PCR quantitativa (QRT-PCR).....</i>	52
<i>Saggio di attività enzimatica dell'SSADH.....</i>	52
<i>Saggio dell'attività della β-galattosidasi.....</i>	53
3.2 Analisi dell'espressione in vitro delle linee cellulari overesprimenti il gene SSADH.....	53
<i>Saggio delle proteine.....</i>	53
<i>Saggio dell'attività della luciferasi per il promotore.....</i>	54
<i>Saggio di citotossicità per linee cellulari stabili.....</i>	54
<i>Misurazione di HNE e HNEAcido.....</i>	55
3.3 Creazione di costrutti per la purificazione delle varianti della proteina SSADH.....	55
<i>Vettori d'espressione per ottenere la proteina ricombinante per le varianti SSADH.....</i>	55
<i>Induzione dell'espressione proteica in colonie batteriche BL21.....</i>	56
<i>Purificazione della proteina ricombinante con la GST.....</i>	56
4 RISULTATI	
4.1 Variazione intra- ed inter-specifica della regione codificante.....	58
<i>Individuazione dello stato ancestrale e derivato per le varianti della regione codificante e loro fase aplotipica.....</i>	58
<i>Espressione dell'enzima SSADH in linee cellulari trasfettate transientemente con le varianti</i>	

<i>della sequenza codificante.....</i>	62
4.2 Variazione intra-specifica della regione del promotore.....	63
<i>Individuazione delle varianti del promotore associate agli aplotipi della regione codificante.....</i>	63
<i>Analisi funzionale della regione del promotore.....</i>	64
4.3 Analisi del possibile ruolo detossificante dell'enzima SSADH.....	68
<i>Ossidazione dell'SSA.....</i>	68
<i>Ossidazione di HNE.....</i>	71
<i>Valutazione di citotossicità indotta da H₂O₂ e dall'HNE.....</i>	72
4.4 Espressione e purificazione della proteina umana SSADH.....	73
5 DISCUSSIONE	
5.1 Evoluzione del gene SSADH: dati intra ed interspecifici.....	76
5.2 Analisi funzionali delle varianti della regione codificante.....	78
5.3 Analisi funzionale della regione promotore.....	78
5.4 Overespressione dell'SSADH: attività e protezione dal danno ossidativo	80
5.5 Espressione in vitro della proteina SSADH umana matura.....	82
6 CONCLUSIONI.....	83
Bibliografia.....	84

Summary

SSADH (named ALDH5A with the new nomenclature) belongs to a large group of related NAD(P)⁺-dependent enzymes which metabolize a wide array of exogenous and endogenous aldehydes, converting them into the corresponding carboxylic acid.

SSADH is a mitochondrial enzyme and serves its major role in the catabolism of the GABA, the most important inhibitory neurotransmitter of the Central Nervous System (CNS), by oxidation of the substrate succinic semialdehyde (SSA) to succinate which enters the Krebs cycle; SSA can be also converted into 4-hydroxybutyric acid (GHB) by tissue specific SSA reductases.

Complete SSADH deficiency results in 4-hydroxybutyric aciduria, a rare recessive autosomal disorder of human metabolism. 4-HBA patients manifest a considerable variability of the clinical phenotype, ranging from mild psychomotor retardation to severe neurological defects, due to the neurotoxic effects of the abnormal accumulation of GABA and GHB in tissues and physiologic fluids.

GHB has an important role as neurotransmitter, in fact it interacts with its and GABA receptors, and as neuromodulator, in fact it is involved in the modulation of several systems, including the dopaminergic and serotonergic ones.

From Gibson et al. 1991 results that in the human population the SSADH activity is more variable: the 4-HBA patients have a lower activity, their sibling and parents a variable activity and the normal people more variable activity.

Recent studies reveal a second role of SSADH: it is one of the two mitochondrial aldehyde dehydrogenases responsible of detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). In particular, SSADH is the primary oxidizing enzyme for HNE in CNS.

HNE is a reactive aldehyde physiologically produced in relatively large amounts from lipid peroxidation.

Elevated levels of HNE in CNS are implicated in the pathogenesis of numerous neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases.

High concentrations of HNE are known to be cytotoxic whereas low concentrations are involved in cell proliferation and gene expression, and in the inhibition of the nucleic acids and proteins synthesis.

By studying more than 50 SSADH deficient families, we identified several pathological variants, including small and large nucleotide deletions and insertions, nonsense and missense mutations, and mutations of splicing sites. We also identified not pathological variants in the coding region. Some of the polymorphic variants are rare and some reach polymorphic frequencies: the G to C transversion in position c.106 and C to T transitions in positions c.538 and c.545.

This study on SSADH is divided into two sections: genetic and functional analysis of variants.

In the genetic section we performed inter and intra-specific analyses of SSADH coding region variants.

Resequencing non human primates DNA, we identified the ancestral and derived alleles for each polymorphic site and we identified those that occurred in the human specific lineage. We observed that both ancestral and derived alleles for the positions c.106 and c.545 are present in almost all human populations and that the ancestral allele is more frequent; whereas the derived allele at the position c.538 has increased its frequency and now represent the majority in human populations. These results has been reported in Blasi et al. 2006, where we hypothesized the possible role of this specific human substitution in the cognitive functions.

Resequencing families and single subjects, we obtained 3 different haplotypes for the most common polymorphisms (c.106 G>C, c.538C>T and c.545C>T): haplotype 1 (GCC), haplotype 4 (GTC) and haplotype 5 (CTT).

As for functional analysis of the coding region variants, we performed transient transfections with cDNAs corresponding to these three haplotypes into HEK293 cell line. When expressing SSADH activity of haplotypes 4 and 5 as percentage of haplotype 1 (100%), they produced 62% and 23% of the activity, respectively, using SSA as substrate, and 72% and 25% of the activity, respectively, using HNE as substrate.

The enzyme activity associated with the three haplotypes showed the same efficiency when the substrate was SSA or HNE.

As for the analysis of promoter region variants we performed an intra-specific analysis by examining several human populations.

In order to characterized the SSADH promoter region we analysed about 100 subjects of different geographic origins by several methods (sequencing, enzyme restriction and dot blot analysis). We identified nine variant positions and obtained the reconstruction of haplotypes and their frequencies.

The haplotypes were subcloned in an expression vector with luciferase as reporter gene and named BK31, BK45 and BK70; the functional analysis of these three promoters was performed by assaying the luciferase activity. We obtained the following results: clone BK31 showed the highest activity (100%) while the others, BK45 and 70, showed about 50% of the activity with respect to BK31.

Another aim of this study was to confirm the second role of SSADH verifying whether it confers protection against HNE and other oxidants. We obtained stable transfected cell lines overexpressing haplotype 1 of SSADH coding region with different gene-dosage. For each stable cell line we measured the RNA expression and enzyme activity on both SSA and HNE as substrates.

For each stable cell line we observed that the difference in RNA expression levels parallels the difference in enzyme activity.

Using MTT assay as a measure of cell viability, we observed that the stable transfected cell lines, with the highest enzyme activity, showed also a significant increase of cell viability after treatment with different concentration of HNE and H₂O₂, confirming a very high efficacy of SSADH overexpressing cells in detoxification.

We concluded that both coding and promoter regions show a very high variability in the human population and some haplotype variant reduce the enzyme activity up to 50% of the most common ones. It would be interesting to perform an analysis on the entire ALDH5A genomic sequence (promoter plus coding region) in order to evaluate the compound effects of the different combinations.

We confirmed the second role of SSADH in the protection against HNE and other oxidants.

It could be useful to genotype for ALDH5A polymorphisms in case-control studies to investigate on possible predisposing effects of some variants to specific neurological disorders.

Overall, these results prompt a future investigation on possible predisposing effects of some variants to specific neurological disorders.

1 INTRODUZIONE

1.1 Le Aldeidi deidrogenasi nei vari organismi

La superfamiglia delle Aldeidi deidrogenasi (ALDH) rappresenta un gruppo di enzimi che catalizza la conversione dei vari tipi di aldeidi alifatiche e aromatiche nei corrispondenti acidi carbossilici, attraverso una reazione NAD(P)⁺-dipendente essenzialmente irreversibile (Yoshida et al., 1998). Le ALDH sono considerate degli enzimi detossificanti che eliminano aldeidi esogene ed endogene. Queste ultime sono prodotte durante la sintesi dell'acido retinoico (Vasiliou e Pappa, 2000) e dal metabolismo di amminoacidi, alcool, vitamine, steroidi e lipidi.

A partire dal 1988, a seguito della purificazione delle proteine ALDH mitocondriali e citosoliche del cavallo (Feldman e Weiner, 1972) e dell'uomo (Greenfield e Pietrusko, 1977), divennero disponibili le prime sequenze amminoacidiche (Hempel et al. 1984; von Bahr-Lindstrom et al. 1984). Da quel momento in poi sono state ottenute le strutture primarie di un gran numero di ALDH di specie anche evolutivamente distanti.

La presenza di geni codificanti per le ALDH nella maggior parte delle specie di archea, eucarioti ed eubatteri, avvalorano l'ipotesi che questi enzimi siano coinvolti in importanti processi metabolici, e che questa superfamiglia derivi da eventi di duplicazione di un gene ancestrale.

Gli allineamenti amminoacidici di ALDH provenienti da vari organismi indicano una identità tra le sequenze proteiche dal 32% al 95% (Hempel et al., 1993).

Il fatto che le ALDH, come molti altri geni, siano presenti sia nell'uomo che nei batteri, indica che il gene ancestrale era presente sul pianeta già 2,1 miliardi di anni fa, tempo al quale, in accordo con le evidenze geologiche e molecolari, si fa risalire la divergenza eucarioti-procarioti (Feng et al. 1997; Gonzalez e Nebert, 1990; Knoll, 1992; Rivera e Lake 1992).

Attualmente la superfamiglia delle ALDH comprende 555 distinti geni presenti in diverse specie: 32 in archea, 351 in eubatteri e 172 in eucarioti. Il sequenziamento completo del genoma di questi organismi ha rivelato che il numero dei diversi geni ALDH in ciascuna specie varia da 1 a 5 in quelle archea, da 1 a 26 in quelle eubatteriche e da 8 a 17 in quelle eucariotiche.

La superfamiglia delle ALDH comprende enzimi che hanno proprietà catalitiche, ed enzimi che legano proteine e interagiscono con sostanze endogene ed esogene di natura diversa.

Quando l'allineamento delle sequenze ALDH provenienti dai 172 eucarioti mostra una identità minore del 40%, esse sono considerate appartenenti a famiglie diverse; quando l'allineamento mostra almeno il 60% d'identità, sono considerate appartenenti alla stessa subfamiglia.

Al momento, l'analisi di 172 ALDH eucariotiche ha permesso la loro suddivisione in 21 famiglie geniche (Vasiliou et al. 2004). Un dendrogramma che rappresenta 49 sequenze eucariotiche di ALDH e comprende tutte le 21 famiglie, è illustrato in Figura 1 (Sophos e Vasiliou, 2003). Molte famiglie di ALDH possono essere riscontrate in molti oppure in un solo organismo; alcune famiglie sono state ritrovate esclusivamente in un gruppo, ciò è dovuto al fatto che c'è una differenza di substrati endogeni e che esistono diverse vie di detossificazione. Per esempio, il dendrogramma mostra che la famiglia ALDH13, in alcune specie delle Entamoebidae, e quella ALDH14, nel lievito, sono molto vicine alla famiglia ALDH3, presente in mammiferi, pesci, piante ed alcune specie eubatteriche; questa situazione denota un'origine comune, probabilmente dovuta ad eventi di duplicazione di un gene ancestrale che ha successivamente subito una divergenza (Sophos e Vasiliou, 2003).

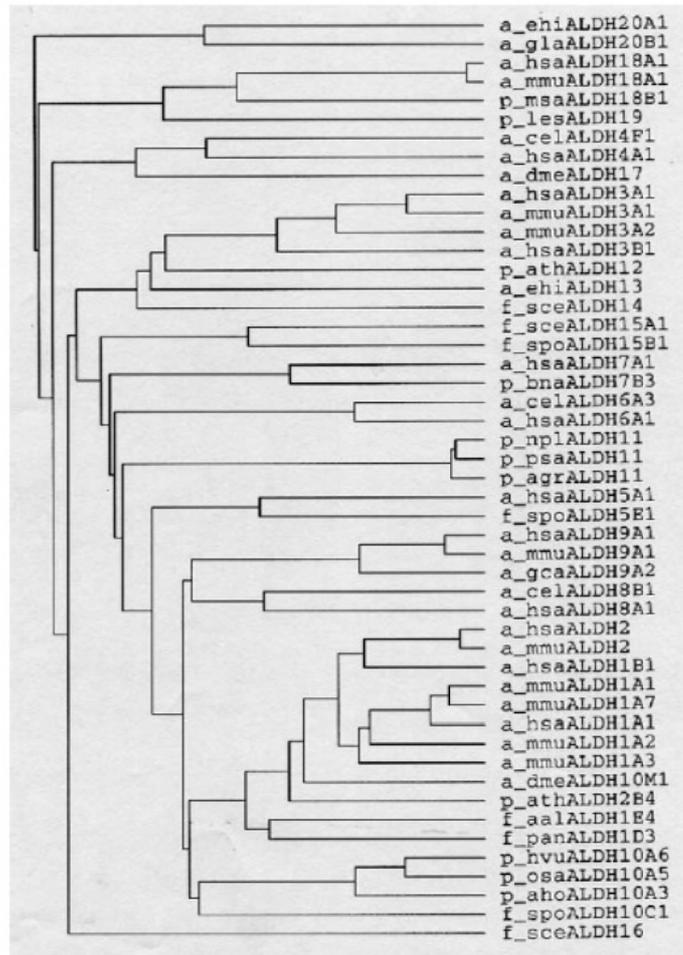


Fig.1 Dendrogramma a cluster di 49 sequenze di Aldh eucariotiche rappresentanti le 20 famiglie di aldeidi deidrogenasi. Il primo carattere indica: animali (a_), piante (p_) e funghi (f_).

1.2 La famiglia delle ALDH nell'uomo

Le varie ALDH umane sono state distinte sulla base delle proprietà chimico-fisiche, enzimatiche, della localizzazione subcellulare e distribuzione tessuto-specifica (Yoshida et al. 1998). La distribuzione tissutale e la localizzazione subcellulare delle singole ALDH sono mostrate nella Tabella 1.

Il genoma umano contiene almeno 17 geni che sono membri della superfamiglia delle ALDH. Questi geni sono localizzati in 10 famiglie e 13 subfamiglie di ALDH (Fig. 2) (Vasiliou et al. 2004).

L'ALDH1A1, l'ALDH1A2, l'ALDH1A3 e l'ALDH8A1 sono coinvolte nella sintesi dell'acido retinico (morfogeno). Tra queste, comunque, l'ALDH1A1 sembra non avere un ruolo essenziale nello sviluppo dell'occhio; questa è espressa nel fegato, rene e pancreas umano, è coinvolta nel metabolismo del folato, e mostra un dominio carbossiterminale con il 50% di omologia con gli altri membri della superfamiglia (Fig.3) (Vasiliou et al. 2004).

Gene	Enzima	Tessuto (distribuzione subcellulare)	Principale substrato	Localizzazione cromosomica
ALDH1A1	ALDH1	<u>Fegato, cristallino, eritrociti (cit.)</u>	Retinale	9q21
ALDH1A6	ALDH6	Ghiandole salivari, stomaco, fegato	Sconosciuto	15q26
ALDH1A7	RALDH2	Sconosciuto	Retinale	15
ALDH1B1	ALDH5	<u>Fegato, rene, muscolo, cuore, placenta (mit.)</u>	Aldeidi alifatiche	9p13
ALDH1L1	FOLATEDH	Sconosciuto	Folato	9q21.13
ALDH2	ALDH2	Fegato, stomaco, ecc. (mit.)	Acetaldeide	12q24
ALDH3A1	ALDH3	Stomaco, polmone ecc. (cit.)	Aldeidi alifatiche ed aromatiche	17p11.2
ALDH3A2	ALDH10	Fegato, cuore, muscolo (micro.)	Aldeidi alifatiche e aromatiche	17p11
ALDH3B1	ALDH7	Rene, polmone (micro.)	Aldeidi alifatiche ed aromatiche	11q13
ALDH3B2	ALDH8	Ghiandole parotidi (micro.)	Sconosciuto	11q13
ALDH4A1	ALDH4	Fegato, rene (mit.)	Glutammato semialdeide	1p36
ALDH5A1	SSADH	<u>Cervello, fegato, cuore (mit.)</u>	Succinico semialdeide	6p22
ALDH6A1	MMSDH	Fegato, rene, cuore, muscolo (mit.)	Metilmalonato semialdeide	14
ALDH7A1	ATQ1 (antiquitina)	Sconosciuto	Sconosciuto	5q31
ALDH8A1	ALDH12	Sconosciuto	Sconosciuto	6q24-25
ALDH9A1	ALDH9	Fegato, rene, muscolo schel.(cit.)	Aldeidi amminiche	1q22-23

Tab. 1 La famiglia delle ALDH umane. I tessuti nei quali alcuni membri della famiglia sono espressi ad elevati livelli sono sottolineati (cit.: citoplasma; mit: mitocondrio; micro.: microsomi) (Yoshida et al., 1988; Vasilou et al., 2000).

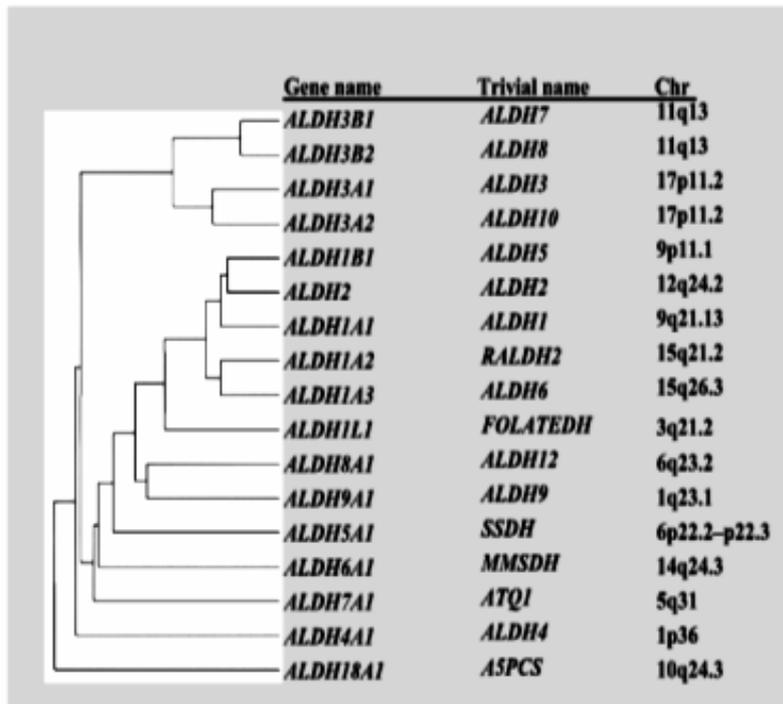


Fig.2 Dendrogramma a cluster e localizzazione cromosomica dei geni delle aldeidi deidrogenasi umane

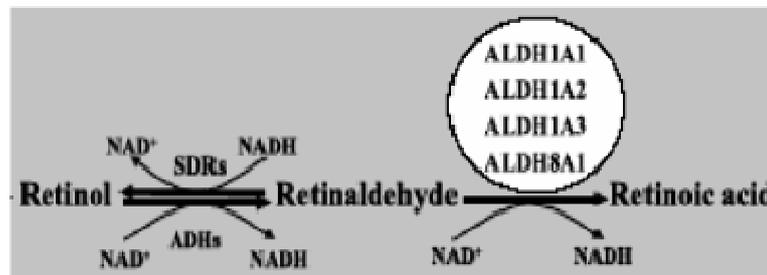


Fig.3 Formazione dell'acido retinoico. Le abbreviazioni utilizzate sono: aldeidi deidrogenasi (ALDH), alcool deidrogenasi (ADH) e deidrogenasi/reduttasi di catene corte (SDR).

1.2.1 Genetica delle ALDH

Sono state descritte molte varianti alleliche associate all'assenza dell'attività enzimatica in ALDH2, ma le mutazioni meglio caratterizzate sono due transizioni, G→A e C→T, nell'esone 12 dell'allele ALDH2*2 che portano a una sostituzione amminoacidica da Gly a Lys in posizione 487. Siccome l'ALDH2 esplica anche un'azione ossidativa detossificante sull'acetaldeide, un deficit nell'attività di questo enzima causa la sindrome di intolleranza all'alcool. Molti studi sono in favore di un'associazione tra l'allele ALDH2*2 e la presenza di cirrosi epatica in individui Cinesi e Giapponesi (Vasiliou et al. 2004). Un altro enzima che ossida le acetaldeidi è l'ALDH1A1, ed anche in questo caso si ritiene che una riduzione della sua attività riscontrata in popolazioni non Asiatiche possa influenzare la predisposizione all'alcolismo (Eriksson, 2001). Recenti studi hanno messo in evidenza che due forme alleliche di questo enzima aumentano la frequenza degli effetti da alcolismo tra gli Afro-Americani (Fig. 4) (Vasiliou et al. 2004). Le ALDH3A1 e le ALDH5A1 catalizzano l'ossidazione della ciclofosfamide (CP), un agente alchilante usato nel trattamento di molte malattie ematologiche. Questo composto è il precursore della 4-idrossiciclofosfamide (4-HCP), che si forma per azione del citocromo P450 epatico. Il 4-HCP circola nel sangue e all'interno delle cellule sottoforma di un suo tautomero, l'aldofosfamide; quest'ultimo può essere trasformato in una serie di composti che formano legami crociati DNA-DNA, oppure subisce l'azione di alcool deidrogenasi, aldeidi reductasi e aldeide deidrogenasi. Nel complesso, sono numerose le ALDH i cui alleli sono stati riscontrati associati a patologie umane, come descritto in Tabella 2 (Vasiliou et al. 2004).

Sono note soltanto poche strutture proteiche terziarie e quaternarie delle ALDH. Nei casi conosciuti, le forme cataliticamente attive degli enzimi sono rappresentate da omodimeri (ALDH3, ALDH4) e omotetrameri (ALDH1, ALDH2, ALDH9, ALDH5). L'allineamento amminoacidico delle varie ALDH umane indica un ampio range di divergenza tra i membri di questa famiglia. L'identità amminoacidica varia da un massimo dell'80% ad un minimo del 15% (Yoshida et al. 1998). Tuttavia, varie regioni proteiche, alcune delle quali con ruolo funzionale, si mostrano altamente conservate. Il ruolo funzionale di alcuni residui evolutivamente conservati è stato identificato anche grazie al contributo della mutagenesi sito-diretta e dei dati cristallografici.

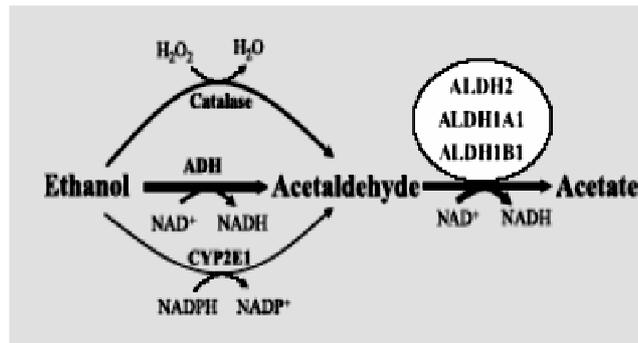


Fig.4 Metabolismo dell'etanolo. Le abbreviazioni sono: aldeidi deidrogenasi (ALDH), alcool deidrogenasi (ADH).

<i>Gene</i>	<i>Phenotype</i>
<i>ALDH1A1</i>	<i>Alcoholism</i>
<i>ALDH1A2</i>	<i>(?) Aldh1a2(-/-) mice are embryonic lethal</i>
<i>ALDH1A3</i>	<i>(?) Aldh1a3(-/-) mice die shortly after birth</i>
<i>ALDH1L1</i>	<i>(?) Low fertility</i>
<i>ALDH2</i>	<i>Alcoholism, increased risk for late onset Alzheimer's disease, hypertension</i>
<i>ALDH3A1</i>	<i>(?) Sensitivity to UV light</i>
<i>ALDH3A2</i>	<i>Sjogren-Larsson syndrome</i>
<i>ALDH4A1</i>	<i>Type II hyperprolinemia</i>
<i>ALDH5A1</i>	<i>4-Hydroxybutyric aciduria</i>
<i>ALDH6A1</i>	<i>Developmental delay</i>
<i>ALDH18A1</i>	<i>Hyperammonemia</i>

Tab.2 Fenotipi e malattie associate a ciascun gene ALDH. Il punto interrogativo (?) indica fenotipi riscontrati nel topo ma non dimostrati nell'uomo.

1.2.2 Ruolo detossificante nei confronti dell'HNE

Le aldeidi deidrogenasi mitocondriali detossificano le aldeidi lipido-derivate compreso il 4-idrossi-2-nonenale (HNE). L'HNE è un'aldeide reattiva prodotta in quantità relativamente alte dalla perossidazione lipidica; i suoi elevati livelli riscontrati nel sistema nervoso centrale sono implicati nella patogenesi di numerose malattie neurodegenerative quali le malattie di Alzheimer e di Parkinson. Un numero sempre crescente di studi mostra i molteplici effetti dell'HNE sui processi cellulari, confermando il ruolo chiave di questo prodotto citotossico come "secondo messaggero" del danno ossidativo (Dwivedi et al. 2007).

L'HNE può essere metabolizzato attraverso numerosi pathways: la coniugazione al GSH da parte della glutatione-S-trasferasi a formare il GS-HNE; la riduzione da parte dell'ADH o aldo-chetoreduktasi a formare 1,4-diidrossinonene (DHN); l'ossidazione da parte dell'ALDH a formare l'acido 4-idrossinoneico (HNE acido) (Fig. 5). Numerosi studi mostrano evidenze sul ruolo rilevante di quattro enzimi ALDH nella detossificazione dell'HNE a produrre HNE acido: ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH2 and ALDH5A1. Le ALDH1A1 e ALDH3A1 sono enzimi citosolici che contribuiscono alla difesa della cornea contro il danno ossidativo derivante dalla metabolizzazione dell'HNE durante il processo di perossidazione lipidica indotto dagli UV e sono espressi in modo differente in numerosi tessuti ma sono stati trovati ad alti livelli nel cristallino e nei cheratinociti stromali (Jester et al. 1999; Lassen et al. 2006).

Gli enzimi mitocondriali ALDH giocano un ruolo importante nella detossificazione dell'HNE e di altre aldeidi nel fegato e nel sistema nervoso centrale (Mitchell and Petersen 1987; Murphy et al. 2003a). E' stato dimostrato che la produzione di HNE acido si ha nelle sezioni di corteccia cerebrale di ratto in seguito all'esposizione all'HNE e questa attività NAD⁺-dipendente risiede principalmente nel compartimento mitocondriale (Murphy et al. 2003a and b).

Numerose prove indicano la partecipazione di ALDH2 nella detossificazione dell'HNE nel fegato (Reichard et al. 2000) e nel Sistema Nervoso Centrale (SNC). L'attività dell'enzima ALDH2 è stata trovata elevata nella corteccia cerebrale dei pazienti con la malattia di Alzheimer (AD), come meccanismo possibile di protezione contro i livelli aumentati di HNE; inoltre, l'alta vulnerabilità all'HNE delle cellule deficienti in ALDH2 geneticamente costruite (Ohsawa et al. 2003) e la mancanza genetica di

ALDH2 trovata associata ad un elevato rischio di AD in una popolazione giapponese (Kamino et al. 2000), sono a sostegno del ruolo protettivo di questo enzima.

L'HNE esiste sotto forma di due enantiomeri, (R)-HNE e (S)-HNE. Nei mitocondri interi di cervello di ratto, l'enantiomero (R)-HNE è selettivamente ossidato a HNE acido. L'ALDH5A purificato da ratto ossida selettivamente l'enantiomero (R)-HNE, mentre l'ALDH2 di ratto non è enantioselettiva. Dati di cinetica che utilizza gli enantiomeri (R)- e (S)-HNE, e il trans-2-nonenale in combinazione con la modulazione computerizzata dell'ALDH5A suggeriscono che l'ossidazione operata dall'ALDH5A è selettiva per l'enantiomero (R)-HNE. La presenza di ioni Mg^{2+} altera l'enantioselettività sia dell'ALDH5A che della ALDH2. Gli ioni Mg^{2+} sopprimono l'ossidazione del (R)-HNE da parte dell'ALDH5A in misura maggiore rispetto ad (S)-HNE. Tuttavia, gli ioni Mg^{2+} stimolano l'ossidazione enantioselettiva di (R)-HNE da parte di ALDH2 mentre sopprimono l'ossidazione di (S)-HNE (Brichac et al. 2007).

Scoperte più recenti hanno dimostrato che la succinico semialdeide deidrogenasi mitocondriale (SSADH/ALDH5A) è inoltre il principale enzima responsabile dell'ossidazione di HNE in mitocondri del SNC (Murphy et al. 2003c).

La determinazione della struttura cristallografica delle ALDH3 nell'uomo (Liu et al. 1997) e ALDH1 nel ratto (Moore et al. 1998; Steinmetz et al. 1997), insieme alle sequenze amminoacidiche dedotte di altre ALDH, hanno rivelato un'area di sorprendente omologia all'interno della regione compresa tra i residui 243 - 302. Questa regione include i residui di Gly 245 e 250, identificati come residui essenziali all'interno del sito GXGXXG di legame al coenzima, dove X è un aminoacido qualsiasi. In altre ALDH la stessa regione continua ad essere mantenuta, sebbene solo il primo residuo di Gly rimanga strettamente conservato, mentre il secondo può cambiare in Thr (GXTXXG). Inoltre, sempre in questa regione, la presenza di una Cys invariante in posizione 302, depone a favore di un ruolo catalitico di questo residuo (Vasiliou et al. 1999).

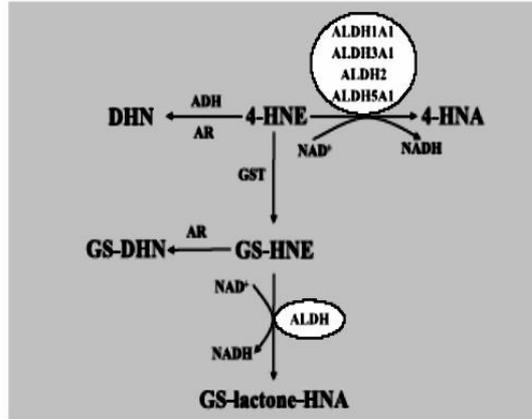


Fig.5 Metabolismo del 4-idrossinonenale. Le abbreviazioni utilizzate sono: aldeide deidrogenasi (ALDH), alcool deidrogenasi (ADH), aldo-cheto-reduttasi (AR), glutazione coniugato (GS-), glutazione -S-transferasi (GST), 1,4-diidrossinonenone (DHN), 4-idrossinonale (4-HNE), acido 4-idrossinonenico (4-HNA)

1.3 L'enzima succinico semialdeide deidrogenasi nelle varie specie

La succinico semialdeide deidrogenasi mitocondriale NAD⁺-dipendente (SSADH/ALDH5A), appartenente alla famiglia delle ALDH umane, è uno dei tre enzimi coinvolti nel catabolismo dell'acido gamma-amminobutirrico (GABA). Il GABA è il più importante neurotrasmettitore inibitorio sinaptico nell'SNC dei Mammiferi. Sebbene forme legate del GABA contribuiscano al pool del neurotrasmettitore nel SNC, la componente libera viene prodotta prevalentemente a partire dall'acido glutammico in una reazione catalizzata dalla Glutammico decarbossilasi (GAD).

Il pathway di degradazione del GABA avviene attraverso l'azione della GABA transaminasi (GABA-T), che converte il GABA a succinico semialdeide (SSA), e dell'SSADH che, ossidando in modo irreversibile la SSA, produce succinato il quale entra nel ciclo di Krebs (Fig. 6).

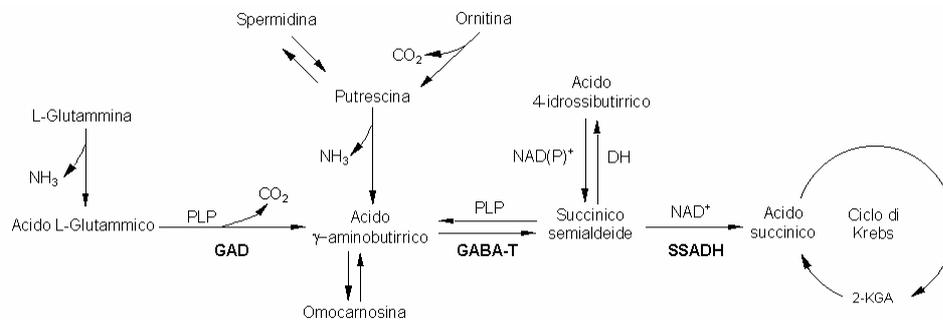


Fig. 6 Alcune delle reazioni del metabolismo del GABA: biosintesi e catabolismo. Le abbreviazioni utilizzate sono: PLP pirodossal-5'-fosfato; NAD(P)⁺ nicotinamide adenina dinucleotide (fosfato); GAD glutammico-decarbossilasi; GABA-T γ -aminobutirrico transaminasi; NAD(P)⁺DH una (o più) 4-idrossibutirrato deidrogenasi NAD dipendenti; SSADH succinico semialdeide deidrogenasi; 2-KGA acido 2-oxoglutarico.

La SSA può anche essere convertita a 4-idrossibutirrato (GHB) dalle SSA riduttasi citosoliche codificate dai geni AKR7A2 e AKR7A3, espresse, rispettivamente nel cervello e nel fegato (Knight et al. 1999; Matthew et al. 2001). La distribuzione tissutale osservata per l'SSADH è simile a quella della GABA-T: entrambe sono mitocondriali e possono interagire

fisicamente come dimostrato dalla cromatografia di affinità e dalle tecniche di fluorescenza (Fig. 7) (Kang et al. 2005).

Il metabolismo del GABA, così come è stato descritto nei Mammiferi (Tillakaratne et al. 1995), è stato identificato anche in alcuni procarioti (Metzer e Halpern, 1990) e nelle piante (Breitkreuz e Shelp, 1995). Nei batteri, il GABA svolge un ruolo nel metabolismo del carbonio e dell'azoto; tale metabolismo aumenta in carenza di azoto, o quando il succinato sostituisce il glucosio come fonte di carbonio. I diversi ruoli delle vie metaboliche del GABA sono state documentate nei Mammiferi e nelle piante, ma poco si sa riguardo i procarioti. È stato dimostrato che nell'*Agrobacterium tumefaciens* il metabolismo del GABA è coinvolto in un sofisticato meccanismo segnale che regola il trasferimento del Ti- plasmide in risposta a particolari condizioni di crescita batterica (Wang et al. 2006).

Nelle piante il GABA è coinvolto nel controllo del pH citosolico, nell'adattamento allo stress e nel bilancio tra i metabolismi carbonioso e azotato. La possibilità che nelle piante il GABA eserciti un ruolo nella trasduzione del segnale, non è ancora stata studiata. Recentemente, è stato clonato il cDNA dell'SSADH anche da *Arabidopsis thaliana*, ed è stato individuato il gene aldH in *Agrobacterium tumefaciens*, che codifica per un omologo dell'enzima succinico semialdeide deidrogenasi (SSADH) ed è NAD⁺-dipendente (Busch e Fromm, 1999; Wang et al. 2006).

Per saperne di più sul ruolo fisiologico del GABA è stato prodotto un modello knockout per il gene SSADH nell'*Arabidopsis thaliana*. I mutanti sono sensibili alle temperature elevate e all'esposizione agli UV che causano un aumento di H₂O₂ associata a morte cellulare. Ciò dimostra che quando ci sono condizioni che impediscono il ciclo degli acidi carbossilici e promuovono l'accumulo di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROS), il ciclo del GABA può impedire l'accumulo di H₂O₂ e favorire la formazione di NADH e/o succinato (Bouchè et al. 2003).

Nei Mammiferi, il metabolismo del GABA è prevalentemente, ma non esclusivamente, associato con le funzioni del GABA quale neurotrasmettitore di tipo inibitorio su un sistema recettore-canale (recettori GABA-ergici) dei centri nervosi encefalici e del midollo spinale. La presenza e la diversa localizzazione del GABA in vari tipi di neuroni è da attribuirsi alle sue molteplici funzioni sia di neurotrasmettitore che metabolita e agente neurodifferenziativo. Il GABA è inoltre presente anche in tessuti ed organi non nervosi tra cui il fegato, i reni, il cuore e le gonadi maschili, sebbene il suo esatto ruolo fisiologico rimanga ancora da chiarire.

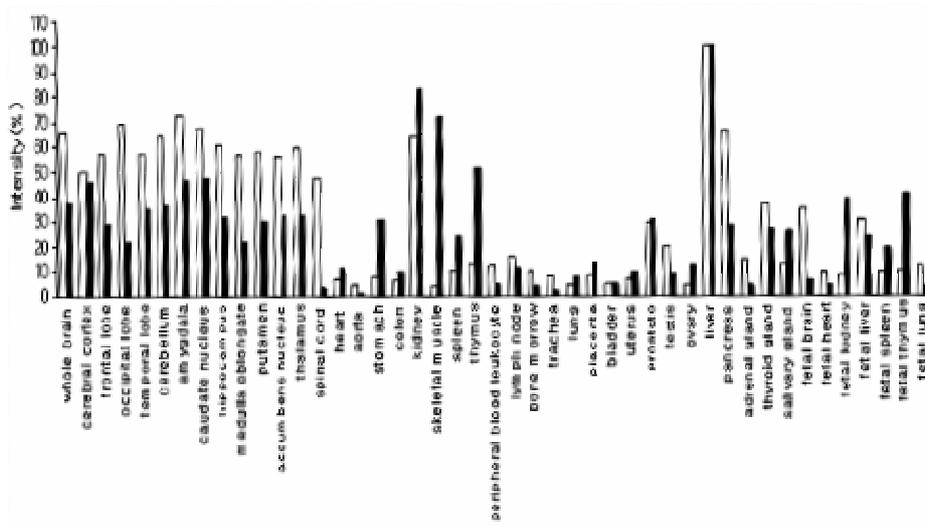


Fig.7 Confronto dei livelli di espressione della GABA-transaminasi e dell'SSADH in tessuti selezionati. I valori sono relativi al più alto valore di espressione tissutale che è stato arbitrariamente fissato a 100.

Il confronto delle sequenze codificanti dell'SSADH in vari organismi ha evidenziato significativi livelli di omologia. In *Arabidopsis thaliana* il cDNA dell'SSADH codifica per una proteina che condivide una elevata identità di sequenza amminoacidica con la proteina batterica, con quella di ratto e con l'SSADH umana (rispettivamente 59,2%, 58,2% e 59,55%). Tra l'SSADH di Mammifero e quella batterica, NADP⁺-dipendente, c'è una significativa omologia che si estende anche per regioni conservate di ALDH generiche.

Il gene *gabD* di *E. coli* codifica per una SSADH (NADP⁺-dipendente) che presenta una omologia del 56% con quella umana e del 54% con quella di ratto. L'omologia a livello proteico fra SSADH batterica e le generiche ALDH di mammifero scende a 36-38% (Chambliss et al. 1995).

La proteina SSADH è stata purificata ed analizzata in molti organismi; esperimenti di immunoprecipitazione della proteina purificata suggeriscono una struttura omotetrameric. Come in tutte le SSADH, è stata predetta nella struttura primaria la presenza del sito di taglio delle proteasi mitocondriali,

che eliminano la sequenza N-terminale di importo in questo compartimento e danno luogo alla proteina matura.

Il confronto delle sequenze amminoacidiche delle SSADH dai procarioti ai Mammiferi ha evidenziato che la porzione carbossiterminale mostra una più alta similarità rispetto a quella amminotermineale. Sono stati identificati molti raggruppamenti amminoacidici comuni (motifs). Per esempio: il sito Glu attivo nel tratto amminoacidico LELGGNAP che corrisponde ai residui 296-303 (263-270 della proteina matura); la sequenza consensus FRNSGQTCVCAN, contenente un importante residuo di Cys attivo che è presente tra i residui 324-335 (291-302 della proteina matura). Inoltre, i residui invariati di Gly, presenti nelle posizioni 245 e 250 della proteina matura, sono coinvolti nel legame al NAD⁺ nelle ALDH citosoliche. Un altro raggruppamento amminoacidico, localizzato tra i residui 384-389 all'estremità carbossiterminale della proteina matura, è EETFPGP, ritrovato in *E. coli*, nel ratto e nell'uomo; questo si ritrova come EEIFGP in *Arabidopsis*. L'allineamento delle sequenze amminoacidiche dell'intera SSADH in *Arabidopsis*, con l'SSADH di batteri e di mammifero è mostrato nella Figura 8 (Busch e Fromm, 1999).

1.4 La succinico semialdeide deidrogenasi (SSADH) umana

1.4.1 Analisi proteica

L'SSADH (ALDH5A) è stata purificata con apparente omogeneità da cervello umano e di ratto (Chambliss e Gibson, 1992; Ryzlak e Pietrusko, 1988). Attraverso l'analisi SDS-PAGE è stato determinato il peso molecolare della singola subunità che è di circa 54 kDa (Chambliss e Gibson, 1992). Questi risultati contrastano con quelli di Ryzlak e Pietrusko (1988), che hanno presentato evidenze a sostegno dell'ipotesi che l'enzima di cervello umano sia un tetramero di subunità non identiche, ciascuna di peso compreso tra 61 e 63 kDa. Altre evidenze sul peso molecolare della subunità della proteina derivano dal subclonaggio del gene dell'SSADH, isolato da una libreria di cDNA di cervello umano, in un vettore di espressione. La proteina priva del peptide responsabile dell'importo mitocondriale, eliminato dopo il suo ingresso nel mitocondrio, risulta avere un peso molecolare di circa 52 kDa (Kang et al. 2005). L'allineamento amminoacidico dell'SSADH umana con altre 16 Aldeidi deidrogenasi umane conferma la conservazione della maggior parte dei residui invariati rintracciati tra gli altri membri di questa famiglia. Questo allineamento include brevi residui di consenso e residui amminoacidici mantenuti con una identità superiore all'87%. Nella famiglia delle ALDH umane, 23 residui invariati, più della metà dei quali sono Gly (11) o Pro (3), riflettono posizioni critiche nel mantenimento della flessibilità conformazionale delle catene peptidiche. La proteina matura nell'uomo possiede invariati 22 dei 23 residui, con l'eccezione della Gly 212 che è una Cys. La Lys 263, invariante in altre Aldeidi deidrogenasi (Perozich et al. 1999), è una Leu nell'SSADH umana e di ratto. Residui invariati di Glu e Cys, ritenuti essenziali alla catalisi (Yoshida et al. 1998) sono mantenuti nell'SSADH umana rispettivamente in posizione 259 e 293.

1.4.2 Identificazione e caratterizzazione strutturale del gene SSADH

Le proteine SSADH purificate da cervello umano e di ratto sono state utilizzate per determinare le rispettive sequenze amminoacidiche e, attraverso oligonucleotidi degenerati, individuare in librerie di espressione i corrispondenti cDNA. Le sequenze proteiche definitive dell'SSADH matura

(dopo il taglio delle proteasi mitocondriali) sia umana che di ratto, sono state determinate con il contributo derivante dal sequenziamento di cloni di cDNA e da quello amminoacidico delle proteine purificate da cervello (Chambliss et al. 1995)

L'SSADH umana e quella di ratto mostrano l'83% di identità nella sequenza nucleotidica e il 91% di identità nella sequenza proteica (Chambliss et al. 1995). Per conferma che i cDNA isolati nelle due specie codificassero per una proteina con attività SSADH, questi sono stati clonati in un vettore appropriato e fatti esprimere nei batteri. L'espressione di una grande quantità di SSADH umana in un sistema batterico è stato utile ai fini dello studio biochimico della proteina e della sua struttura terziaria (Chambliss et al. 1995; Kang et al. 2005).

Nel 1996 il gene codificante l'SSADH umana è stato mappato nella regione cromosomica 6p22 attraverso la costruzione di un contiguo di cloni di cromosomi artificiali di lievito (YAC) ottenuta nel laboratorio di Genetica delle Popolazioni di Tor Vergata. Si tratta di un singolo locus genomico di circa 38 kb, delimitato dai marcatori genetici D6S276 e D6S1921 e trascritto con un orientamento che va dal telomero al centromero (Malaspina et al. 1996). Da quel momento in poi, il nostro laboratorio si è occupato della caratterizzazione molecolare e funzionale del gene SSADH.

L'ORF completo derivato dall'assemblaggio di EST parziali umane è costituito da 1605 bp, con 10 esoni codificanti per 535 aminoacidi che comprendono i primi 47 residui del peptide di importo mitocondriale (141 bp), assente nella proteina matura che presenta 488 aminoacidi (Fig. 9) (Kang et al., 2005). Il sito di inizio della traduzione ATG è situato in posizione g.38650, mentre il codone di stop TAG è localizzato in posizione g.77363, usando come riferimento la sequenza genomica dell'SSADH disponibile in banca dati (acc. n. AL031230) (Fig. 10). Mediante una ricerca computazionale nelle banche dati di EST e l'analisi condotta in laboratorio su RT-PCR di RNA poliadenilati, provenienti da differenti linee cellulari e di cervello umano, è stata individuata una isoforma dell'mRNA di SSADH contenente un ulteriore esone di 39 bp localizzato tra gli esoni 4 e 5 (esone 4B). L'esone 4B codificherebbe per 13 amminoacidi aggiuntivi, senza alterare l'ordine di lettura della sequenza codificante. Per verificare l'ipotesi che la presenza di trascritti con e senza l'esone 4B fosse il risultato di uno splicing alternativo, sono stati effettuati esperimenti di RT-PCR con primers localizzati a monte e a valle degli esoni 4 e 5. La coesistenza dei due prodotti di amplificazione di 178 bp e 139 bp corrispondenti, rispettivamente, alla presenza e alla assenza dell'esone 4B è stata dimostrata in diverse linee

cellulari (Fig. 11) (Blasi et al. 2002). E' stato inoltre verificato che le due isoforme sono presenti in percentuali variabili nei linfociti di un campione di soggetti normali, come evidenziato anche dal sequenziamento di RT-PCR esone-specifiche in Figura 11 (Blasi et al. 2002).

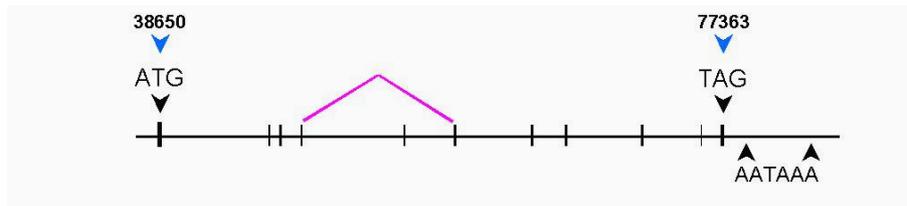


Fig.10 I numeri in alto sopra i codoni di inizio (ATG) e di terminazione (TAG) si riferiscono alla posizione sul DNA (ac. n. AL031230). Le due frecce in basso indicano i due siti di poliadenilazione che distano 3.5 kb l'uno dall'altro e che rendono conto dei 2 trascritti da 2 a 5 kb. La barra inclinata indica i siti di splicing alternativo fuori dall'esone 4B.

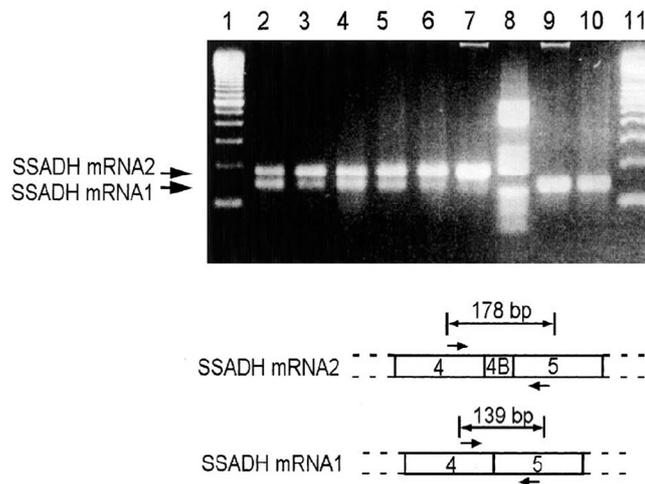


Fig.11 L'RT-PCR dimostra lo splicing alternativo dell'esone 4B. I prodotti mostrati nelle diverse linee sono stati ottenuti dall'RNA poli (A⁺) di cervello (2), HepG2 (3), HEK293 (4), CHP100 (5) ed HeLa (6). I controlli sono rappresentati dalle linee 7, 9, 10 che riportano, rispettivamente, i cDNA dei cloni 703873, con l'esone 4B, e R20294 e H20294, senza l'esone 4B. in basso è rappresentato schematicamente la PCR delle due forme e la rispettiva dimensione.

1.4.3 5'UTR del gene SSADH

L'analisi computazionale per individuare la sequenza promotore nelle 5 Kb situate a monte della sequenza codificante dell'SSADH ha rilevato la presenza di diversi possibili siti di regolazione della trascrizione a monte dell'ATG. Nel laboratorio di Genetica delle Popolazioni di Tor Vergata è stata condotta l'analisi sperimentale per individuare la regione regolativa del gene. Per fare ciò sono stati realizzati dei costrutti contenenti porzioni diverse della sequenza genomica di 5 kb clonate a monte della luciferasi quale gene reporter (Fig. 12) (Blasi et al. 2002).

L'analisi dell'attività luciferasica ha permesso di identificare una regione regolativa nelle 800 bp a monte dell'ATG che consiste in una sequenza di regolazione negativa, tra -811 e -387 (che produce un aumento dell'attività enzimatica di due volte quando deleta), ed una sequenza necessaria all'attività del promotore, tra -387 e -184 (Fig. 12) (Blasi et al. 2002).

Inoltre, esperimenti di protezione dall'RNAsi hanno permesso di identificare il sito d'inizio della trascrizione a -122 dall'ATG (Blasi et al. 2002). Questo sito di inizio è localizzato all'interno di una isola CpG (individuata anche con l'analisi computazionale) che si estende per 1 kb, dalle prime 300 bp del primo introne del gene fino a 400 bp a monte dell'ATG. Sono invece assenti in questa regione sequenze quali TATA e CAAT box (Blasi et al. 2002).

1.4.4 3'UTR del gene SSADH

Sia l'analisi di banche dati EST che i dati sperimentali su DNA genomico dimostrano la presenza di due siti di poliadenilazione situati, rispettivamente, a 98 e 3495 bp a valle del codone di stop. Ciò spiega l'esistenza di un trascritto corto (S) di 1827 nucleotidi e di uno lungo (L) di 5225, evidenziati dall'analisi di Northern blot di diversi tessuti sia umani che murini. Mentre l'utilizzo alternativo dei due siti di poliadenilazione è stato confermato da esperimenti in vitro (Fig. 13) (Blasi et al. 2002), rimane ancora da chiarire il significato del loro diverso rapporto nei vari tessuti esaminati. Infatti, mentre alcuni tessuti, come cervello e pancreas, esprimono prevalentemente il trascritto L di 5225 nucleotidi, altri tessuti, come cuore, fegato, muscolo scheletrico e reni, così come varie regioni cerebrali, esprimono quantità

apprezzabili di entrambe le isoforme S ed L (Fig. 14) (Chambliss et al. 1995).

In saggi di stabilità in vitro dei trascritti, non è stata rilevata alcuna differenza attribuibile alla diversa lunghezza dei 3' UTR, come neppure una differente associazione con i polisomi, indice di un differente livello di traduzione cellulare. Non è invece ancora dimostrato se l'esone 4B sia presente o meno in entrambi i trascritti S ed L (Blasi et al. 2002).

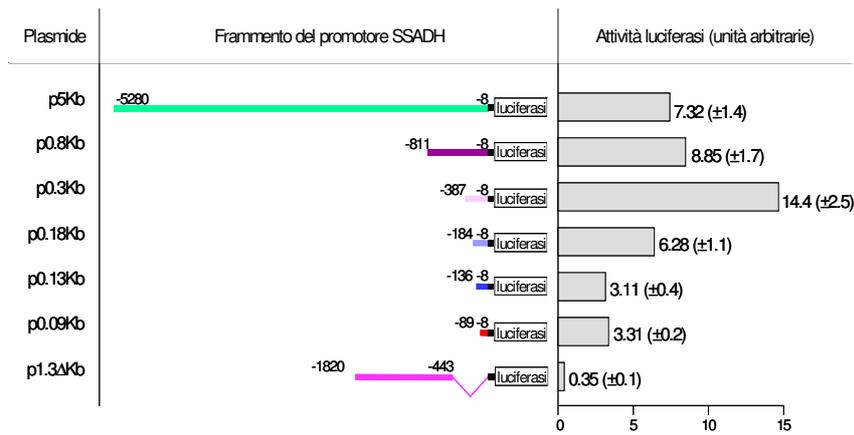


Fig. 12 Attività luciferasica dei costrutti SSADH. Schemi e nomi dei costrutti che sono stati transientemente cotrasfettati con il plasmide che esprime la β -galattosidasi in HEK293. Le unità arbitrarie di luciferasi si riferiscono a conte per secondo (ottenute con il luminometro Perkin Elmer) per μ g di estratto proteico per picomoli di DNA trasfettato. Questi valori sono stati normalizzati per l'attività di β -gal di ciascun estratto e ulteriormente normalizzati per il vettore luciferasi sotto il controllo di un promotore costitutivo, considerato come standard interno ciascuna trasfezione (Blasi et al., 2002).

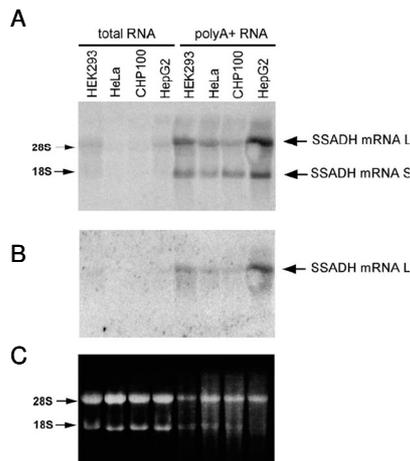


Fig. 13 Analisi di Northern blot di differenti linee cellulari. L'RNA totale e quello poli(A)⁺ delle cellule indicate vengono fatti correre su gel di formamide-agarosio e successivamente trasferiti su membrana. (A) Ibridazione della membrana con cDNA marcato, che presenta l'intera regione con i due siti di poliadenilazione, e (B) con un frammento di PCR marcato, contenente solo la regione a valle del sito di poliadenilazione prossimale. (C) Marcatura del gel con etidio bromuro (Blasi et al., 2002).

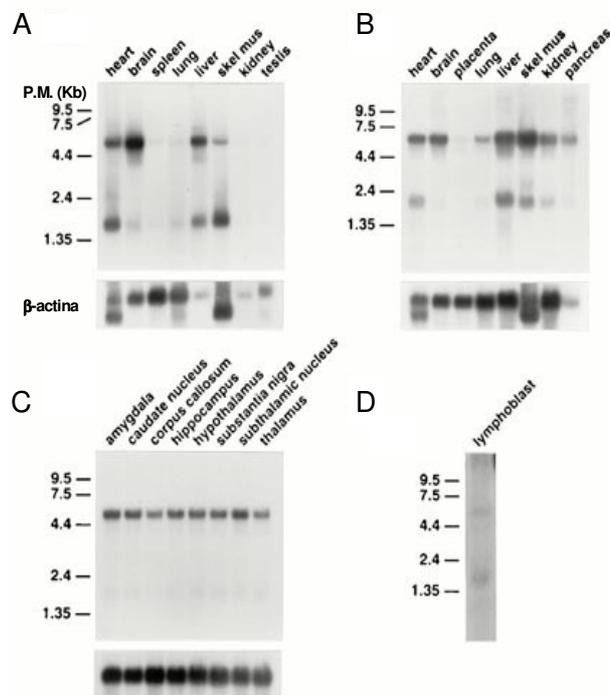


Fig. 14 Analisi di Northern blot dell'RNA poli(A)⁺ proveniente da tessuti di ratto e umani. (A) tessuti di ratto; (B) tessuti umani; (C) frazione di cervello umano; (D) coltura di linfoblasti umani. I filtri A, B e C sono stati reibridati con un probe di β -actina umana, per controllare i livelli di RNA tra le corsie (pannelli al di sotto dei filtri) (Chambliss et al., 1995).

1.5 La deficienza di succinico semialdeide deidrogenasi

La deficienza di succinico semialdeide deidrogenasi, o 4-idrossibutirrico aciduria (4-HBA), è una malattia autosomica recessiva determinata da alterazioni nella degradazione del GABA. Normalmente l'SSADH lavora in sinergismo con la GABA-T per convertire il GABA in acido succinico (SA) che può essere usato nel ciclo di Krebs. Questa via metabolica è molto importante nei mitocondri del cervello, collegando il metabolismo dei due neurotrasmettitori, glutammato e GABA, alla produzione di energia (Pearl et al. 2003). A causa della deficienza enzimatica di SSADH, la succinico semialdeide (SSA) viene convertita ad alti livelli in 4-idrossibutirrato (GHB), da parte di una specifica SSA reduttasi citosolica, ed in parte in GABA, dalla GABA-transaminasi (Fig. 15).

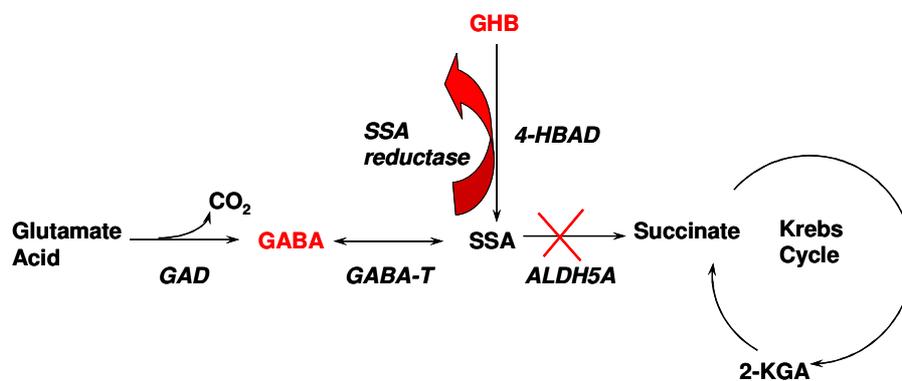


Fig. 15 Alterazione della via di degradazione che determina l'accumulo di GABA e GHB. La deficienza completa di SSADH determina una rara malattia autosomica recessiva denominata 4-idrossibutirrico aciduria (4-HBA).

Dopo la descrizione del primo caso di 4-HBA (Jakobs et al. 1981), la malattia è stata identificata in circa 400 individui provenienti da diverse parti del mondo (Pearl et al. 2003). Circa il 40% delle famiglie analizzate risulta avere genitori consanguinei.

La 4-HBA si manifesta come una malattia neurologica non specifica. I pazienti mostrano una enorme variabilità dei sintomi, con un generale ritardo nello sviluppo psicomotorio e del linguaggio (Gibson et al. 1998).

Bambini con deficienza di SSADH manifestano una notevole variabilità di sintomi che includono, in più del 70% dei casi, ritardo psicomotorio, ritardo nel linguaggio e ipotonia, mentre nel 30-70% dei pazienti insorgono attacchi epilettici, iporeflessia, atassia, problemi comportamentali e ipercinesesi.

La malattia è causata dall'accumulo di due componenti endogeni neuroattivi, il GHB e il GABA, e può essere diagnosticata mediante un'analisi quantitativa degli acidi organici nelle urine attraverso gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa. Il GHB viene escreto dagli individui affetti in grosse quantità (permanenza nelle urine per più di 12 ore) che possono arrivare fino a 200 volte il normale dosaggio. Il GHB si accumula anche nel plasma e nel fluido cerebrospinale, ma è difficile da dosare a causa della sua elevata volatilità e la sua breve emivita di circa 20-30 minuti (Snead and Gibson, 2005).

Una conferma della diagnosi della malattia può derivare dall'analisi fluorimetrica usata per misurare l'attività enzimatica dell'SSADH nei linfociti, linfoblasti o fibroblasti dei pazienti. Un'attività enzimatica <5% conferma la diagnosi.

L'analisi fluorimetrica dell'attività SSADH ed i metodi per il dosaggio del GHB facilitano la diagnosi prenatale della malattia, effettuando in parallelo la ricerca di specifici metaboliti nel liquido amniotico e facendo dosaggi enzimatici su amniociti in coltura e altri tessuti fetali (Gibson, 2005).

Un contributo alla diagnosi della malattia può provenire anche dalla risonanza magnetica (MRI) cerebrale che in alcuni pazienti evidenzia un aumento bilaterale di intensità a livello del globo pallido, della materia bianca subcorticale, del nucleo dentato cerebellare e del tronco encefalico, inclusa la substantia nigra (Knerr et al. 2007; Pearl et al. 2003). Mediante una MRI spettroscopia è stato individuato un aumento del GABA di circa tre volte rispetto alla concentrazione normale nel parenchima cerebrale di pazienti con deficit nell'enzima SSADH.

Dall'analisi del fluido cerebrospinale di individui affetti da 4-HBA è emersa una diminuzione della concentrazione di glutammine, in concomitanza con l'aumento del GABA. Ciò suggerisce un disturbo nel sistema navetta glutammina-glutammato utile per rifornire i neuroni di glutammina, che è un precursore del glutammato e del GABA, che proviene dagli astrociti (Fig. 16). Quando questo sistema viene perturbato, si può verificare un disaccoppiamento del normale bilancio tra l'attività eccitatoria del glutammato e quella inibitoria del GABA, che può essere responsabile

degli attacchi convulsivi, uno dei sintomi comuni riscontrati nella malattia (Pearl et al. 2003).

Una diminuzione dell'attività SSADH nei genitori dei pazienti, portatori eterozigoti di un allele patologico, non determina significative alterazione cliniche, anche se è presente una attività enzimatica più bassa del normale. Sono stati comunque recentemente descritti casi di genitori o fratelli eterozigoti di pazienti con 4-HBA con un fenotipo neurologico caratterizzato da epilessia con assenza (absence seizure) o epilessia mioclonica, associato ad un caratteristico tracciato dell'elettroencefalogramma (Dervent et al. 2004).

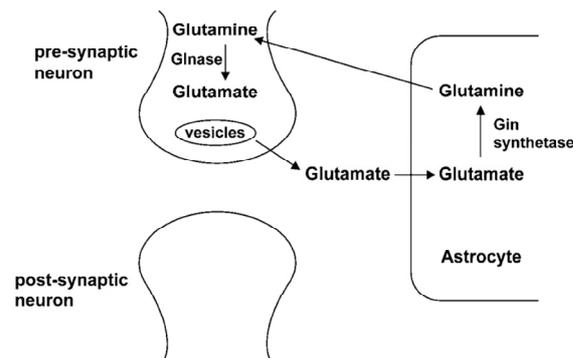


Fig.16 Il diagramma schematico rappresenta il ciclo del glutammato tra i neuroni pre-sinaptici e gli astrociti, con la localizzazione delle glutamminasi nei neuroni e le glutammine sintetasi negli astrociti.

1.5.1 Ruolo del GHB

Il GHB è un corta catena di acidi grassi presente naturalmente nei Mammiferi (cervello, cuore, fegato, e rene) ad una concentrazione di 1-5 μM . Nel cervello di Mammifero la concentrazione del GHB è <1% rispetto a quella del GABA. È stato dimostrato che questo composto è in grado di reagire con recettori dopaminergici, recettori GABA_A e GABA_B, recettori NMDA talamici, siti serotoninergici e recettori degli oppioidi (Fig. 17). Il GHB ha molte proprietà che ne suggeriscono un ruolo nel cervello quale neurotrasmettitore e/o neuromodulatore. La conferma di un possibile ruolo del GHB nel cervello deriva da altre evidenze che lo coinvolgono quali: una distribuzione subcellulare discreta e la presenza di enzimi per la sua sintesi nelle terminazioni presinaptiche neuronali; siti di legame ad alta affinità; il riassorbimento sodio-dipendente nelle terminazioni sinaptiche; l'alterazione nel rilascio glutammato/GABA (Fig. 18) (Gibson, 2005).

Il GHB somministrato in modo esogeno è in grado di superare la barriera emato-encefalica e produrre cambiamenti elettrofisiologici (EEG), comportamentali e biochimici, anche in altre specie animali (gli effetti sono collegati alla quantità somministrata) (Tab. 3) (Gibson, 2005). L'aumento del GHB nel cervello inibisce il rilascio della dopamina e aumenta il turnover di serotonina e dopamina. Il disturbo del metabolismo serotoninergico e dopaminergico potrebbe essere coinvolto nel disordine dei movimenti osservato in molti affetti da 4-idrossibutirrico aciduria. (Pearl et al. 2003).

Il GHB, oltre ad avere molti effetti neurofarmacologici e neurofisiologici, trova ampia applicazione in campo clinico (Gibson et al. 1998). Molti dei meccanismi di interazione del GHB sono stati compresi attraverso l'uso di questo composto come farmaco. Inizialmente veniva impiegato come farmaco per l'induzione dell'anestesia negli interventi chirurgici sui bambini, ma il suo uso è scomparso nel tempo a causa dell'assenza di effetti analgesici e per la presenza di effetti collaterali epilettogenici. Per quanto concerne il suo uso farmacologico, il GHB viene attualmente utilizzato per il trattamento della narcolessia (grave disturbo del sonno) e dell'astinenza da alcool.

<i>Dose orale</i>	<i>Effetti nell'uomo</i>
<i>10 mg/kg</i>	<i>amnesia a breve termine</i>
<i>20-30 mg/kg</i>	<i>sonno</i>
<i>50-60 mg/kg</i>	<i>coma, attacchi epilettici</i>
<i>Dose sistemica</i>	<i>Effetti nel topo</i>
<i>10-50 mg/kg</i>	<i>danni alla memoria</i>
<i>75-200 mg/kg</i>	<i>attacchi epilettici con perdita di conoscenza</i>
<i>200-300 mg/kg</i>	<i>torpore</i>
<i>> 300 mg/kg</i>	<i>coma, EEG anormale</i>
<i>1,7 g/kg</i>	<i>dose letale per il 50% dei casi</i>

Tab.3 *Effetti neurofarmacologici e neurofisiologici del GHB nell'uomo (Gibson, 2005)*

Più recentemente il GHB ha ritrovato popolarità come stupefacente sotto il nome di ecstasy liquida, per gli effetti disinibitori, spesso ottenuti in associazione ad altre sostanze come alcool o oppiacei. Un uso illecito è stato riscontrato anche nelle palestre, da parte di culturisti (body builder), per il suo effetto di aumento della massa muscolare e diminuzione di quella grassa, dovuto ad un'azione esercitata sull'ormone della crescita.

Dal punto di vista farmacologico, il trattamento con GHB determina alterazioni dello stato psico-fisico in relazioni al dosaggio. Basse dosi determinano uno stato di euforia, mentre alte dosi inducono effetti sedativi o anestetici (Tab.4).

Sia il GABA che il GHB vengono rilasciati da neuroni GABA-ergici depolarizzati. Mentre sul recettore GABA_A agisce solo il GABA, causando un effetto inibitorio veloce, sul recettore GABA_B agiscono sia il GABA che il GHB, causando un effetto inibitorio post-sinaptico lento. Il legame dei due composti neuroattivi al recettore GABA_B causa una inibizione del rilascio di GABA. È stato osservato che in topi *Aldh5a1^{-/-}* una elevata concentrazione di GHB e GABA causa una diminuzione delle funzioni mediate dal recettore

GABA_B, probabilmente per una sua iperstimolazione e successiva downregolazione (Buzzi et al. 2006; Gibson, 2005).

Esperimenti in vivo su animali suggeriscono che a concentrazioni fisiologiche il GHB si leghi a recettori specifici (GHB-R), non ancora ben identificati, mentre a concentrazioni più elevate si leghi ai recettori GABA_B. Una concentrazione micromolare di GHB, normalmente presente nel cervello di Mammifero, agisce con alta affinità su recettori specifici GHB-R che hanno una struttura molto simile a quella del GABA_B. La somministrazione esogena del composto agisce direttamente, e con bassa affinità, sul recettore GABA_B che ne media gli effetti farmacologici, comportamentali, clinici e tossicologici (Gibson, 2005; Snead e Gibson, 2005).

Tab.4 Proprietà psicoattive del GHB.

Uso illecito	Effetti clinici	
	Maggiori	Minori
Aumento della massa muscolare (Body building)	Mioclonia	Bradycardia
Trattamento della narcolessia	Atassia	Ipotensione
Trattamento per la diminuzione del peso	Confusione	Nausea
Trattamento della dipendenza dall' alcool	Allucinazioni	Vomito
Uso come sostanza euforizzante	Attacchi epilettici	Aumento della libido
	Perdita di conoscenza	Amnesia
	Difficoltà respiratoria	Tremore
	Ipotonia	Euforia
	Coma	Nistagmo

1.5.2 Intervento terapeutico nella 4-HBA umana

Anche se la 4-HBA è una malattia per la quale non è stata individuata una terapia specifica, alcuni farmaci possono alleviarne la sintomatologia. Tra questi c'è l'antiepilettico vigabatrina che in alcuni casi può avere effetti benefici. La vigabatrina è un analogo del GABA ed è un inibitore irreversibile della GABA-transaminasi, che produce SSA, il substrato per la reazione SSADH-dipendente. Gli effetti di questo inibitore sarebbero da collegare all'aumento della concentrazione di GABA libero e totale, ed alla diminuzione di SSA intracellulare e GHB nel fluido cerebrospinale (CSF) (Gropman, 2003). Dai livelli di GHB misurati nel CSF di alcuni pazienti, precedentemente trattati con vigabatrina, è emerso che la sua concentrazione nel cervello non cambia. Ciò può essere spiegato dall'azione di transaminasi di organi periferici, soprattutto quelle del fegato, in grado di produrre GHB che attraversa la barriera emato-encefalica (Sgaravatti et al. 2007).

I risultati clinici ottenuti dal trattamento con vigabatrina sono vari; questi comprendono: miglioramenti nell'atassia e nel linguaggio, oppure peggioramento dei sintomi e disturbi del campo visivo (Knerr et al. 2007). E' stato inoltre descritto un effetto neuroprotettivo esercitato dalla taurina, un amminoacido presente nel latte materno che migliora i sintomi dell'epilessia (interagendo con i recettori GABA_A e GABA_B). Altri potenziali agenti terapeutici possono essere gli antagonisti del recettore GABA_B, oppure l'utilizzo di agonisti del recettore specifico per il GHB (Hogema et al. 2001; Pearl et al. 2003).

1.5.3 Modello murino per la 4-HBA umana

Per comprendere meglio la patofisiologia della deficienza dell'SSADH umana e sperimentare nuove strategie terapeutiche, è stato realizzato un modello murino knockout per il gene *Aldh* mediante un sistema di ricombinazione omologa Cre-Lox, che ha permesso la delezione dell'esone 8 e l'alterazione del sito attivo dell'enzima (Gibson, 2005; Hogema et al. 2001).

Nei topi omozigoti *Aldh5*^{-/-} è stato osservato un elevato aumento di GABA e GHB in fegato, cervello e urine, e assenza completa di attività enzimatica SSADH. Questi, inoltre, mostrano un'alterazione dei livelli degli amminoacidi glutammina, alanina e arginina nelle differenti regioni del cervello (Dervent et al. 2004).

Il topo $Aldh5^{-/-}$ mostra una generale diminuzione delle dimensioni corporee ed una quasi totale assenza di massa grassa, forse causati da un'alterazione dell'ormone della crescita dovuto agli alti livelli del GHB accumulato.

Non sono invece riscontrabili alterazioni a livello biochimico, fisico o comportamentale a carico dei genitori eterozigoti (Knerr et al. 2007).

La presenza di una grave epilessia tonico-clonica determina la morte nel 100% dei casi tra 16 e 22 giorni dalla nascita, all'inizio del periodo dello svezzamento.

I topi $Aldh5^{-/-}$ sono stati utilizzati per provare l'efficacia di alcuni farmaci antiepilettici, come la vigabatrina e il fenobarbitale, i quali sono risultati tutti associati ad un aumento della vita media. In particolare, il trattamento con dosi alte di vigabatrina, oltre a determinare un allungamento della vita dei topi, ritarda la comparsa dello stato convulsivo generalizzato.

Anche il trattamento con antagonisti dei recettori del GHB, NCS-382 e CGP35348, ha mostrato effetti positivi sulla sopravvivenza di topi deficitari dell'SSADH (Gibson, 2005; Gropman, 2003). Studi effettuati su topi $Aldh5^{-/-}$ confermano che la deficienza di SSADH si riflette sul sistema glutamina-glutammato, come riscontrato anche nell'uomo. Evidenze sulla patofisiologia della 4-idrossibutirrico aciduria derivano da esperimenti su topi $Aldh5^{-/-}$, nei quali è stato osservato danno ossidativo e disfunzioni nell'ippocampo.

Il glutatione è un componente importante del sistema antiossidante cellulare non enzimatico; la sua concentrazione è correlata con il grado di stress ossidativo intracellulare. È stato osservato che la somministrazione di GHB in topi normali causa una diminuzione delle difese antiossidanti non enzimatiche. Nei topi $Aldh5^{-/-}$ è stata riscontrata una diminuzione del glutatione nell'omogenato di ippocampo e della corteccia cerebrale, che indica l'aumento di stress ossidativi in questa area e la formazione di specie reattive dell'ossigeno (Sauer et al. 2007; Sgaravatti et al. 2007).

L'amminoacido taurina sembra avere potenzialità neuroprotettive contro gli effetti del GHB in topi $Aldh5^{-/-}$, ma solo fino allo svezzamento (Gropman, 2003; Hogema et al. 2001).

1.5.4 Modello vegetale per la 4-HBA

In *Arabidopsis* il gene codificante per l'enzima SSADH è stato distrutto tramite l'inserzione di un elemento di T-DNA (Bouché et al. 2003). La deficienza dell'enzima SSADH porta ad un accumulo di agenti ossidanti quali l' H_2O_2 che viene prodotto in seguito all'esposizione alla luce e allo stress da calore. È stato anche osservato l'accumulo di intermedi reattivi dell'ossigeno a causa di un'alterata biosintesi della clorofilla e dell'eme; ciò determina la formazione di lesioni necrotiche, nanismo e ipersensibilità a stress ambientali. Le piante knockout presentano i livelli di GHB cinque volte più alti del normale. Il trattamento con vigabatrina previene l'accumulo di H_2O_2 e permette la normale crescita della pianta. La vigabatrina è stata anche utilizzata con successo come trattamento contro la tossicità da ossigeno iperbarico, una condizione che induce l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (Fait et al. 2005).

1.6 Variabilità' patologica e non patologica del gene SSADH

1.6.1 Mutazioni patologiche identificate

La caratterizzazione molecolare del gene ALDH5A1 in pazienti 4-HBA provenienti da oltre 50 famiglie non imparentate di diversa origine geografica, già classificati con evidenze biochimiche e cliniche, ha portato all'individuazione di 39 mutazioni geniche. Nessuna delle mutazioni descritte presenta una frequenza preponderante ed al momento non sono emerse evidenti correlazioni genotipo-fenotipo.

Complessivamente, le mutazioni individuate includono: delezioni (6) e inserzioni (4) più o meno estese, mutazioni nonsense (7), mutazioni missense (14) e variazioni in siti di splicing (8) (Fig. 19).

I cDNA relativi a 10 mutazioni missense sono stati espressi in vitro e l'attività enzimatica è risultata essere tra 0 e 17% rispetto al genotipo più comune e ciò ha confermato il loro ruolo patologico specificando per un proteina alterata priva di attività enzimatica (Fig. 20) (Akaboshi et al. 2003; Blasi et al. 2006; Chambliss et al. 1998; Lemes et al. 2006).

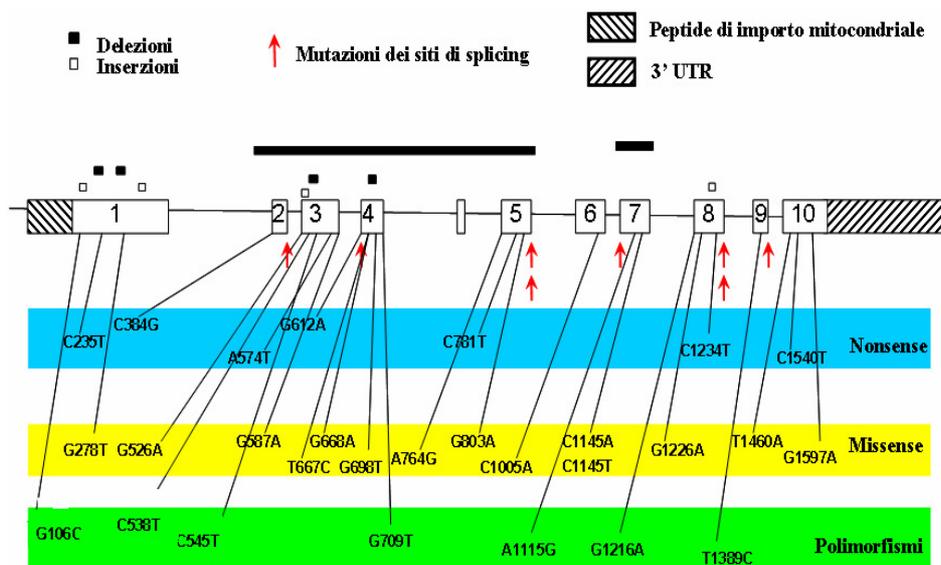


Fig.19 Mutazioni patologiche e polimorfismi del gene SSADH. In celeste e giallo sono mostrate le mutazioni patologiche. In verde sono mostrati i polimorfismi

Missense Mutation	Aa substitution	Expressed SSADH activity %
w.t.		100
G 278 T	C 93 F	2.7
G 526 A	G 176 R	-2.0
G 668 A	C 223 Y	5.4
G 698 T	T 233 M	4.0
A 764 G	N 255 S	17.0
G 803 A	G 268 E	-0.9
C 1005 A	N 335 K	0.6
C 1145 T	P 382 L	1.9
G 1226 A	G 409 D	-1.3
G 1597 A	G 533 R	-2.9

Fig.20 Espressione in vitro delle mutazioni missense patologiche dell'SSADH in cellule di mammifero

1.6.2 Analisi popolazionistica e ruolo funzionale delle varianti polimorfiche della regione codificante

Un iniziale sequenziamento della regione codificante in un campione di individui italiani ha permesso l'identificazione di 7 mutazioni, 6 di tipo missense ed 1 samesense (Tab. 5) (Blasi et al. 2002). L'estensione dell'analisi ad un campione costituito da individui di diversa origine geografica ha mostrato che delle 8 mutazioni missense solo 4 (c.106G>C, c.538C>T, c.545C>T e c.709G>T) raggiungono frequenze polimorfiche nella maggior parte delle popolazioni.

La genotipizzazione del campione non ha comunque incluso l'unica mutazione samesense riscontrata (c.1389T>C).

La mutazione c.106G>C (corrispondente alla posizione 106 nella codificante e g.38755 in AL031230) risiede nell'esone 1 nella porzione peptidica rimossa dopo l'importo mitocondriale; essa causa una sostituzione di Gly, in posizione 36 della proteina, in Arg.

Entrambe le mutazioni c.538 (g.47015 in AL031230) e c.545 (g.47022 in AL031230), localizzate nell'esone 3, sono delle transizioni C>T e distano solo 7 coppie di basi l'una dall'altra; la prima causa una sostituzione del residuo His, in posizione 180 della proteina matura, con Tyr, la seconda una sostituzione del residuo Pro, in posizione 182 della proteina matura, con Leu. Infine, la mutazione c.709G>T (g.48621 in AL031230), che risiede nell'esone 4, determina una sostituzione del residuo Ala, in posizione 273 della proteina matura, con Ser.

Per valutare l'effetto funzionale di ciascuna mutazione con cambiamento amminoacidico sull'attività enzimatica, sono stati clonati i cDNA corrispondenti ottenuti mediante mutagenesi sito-specifica ed espressi in cellule di mammifero. L'attività dell'SSADH determinata in vitro ed espressa in nmol di NADH prodotto al minuto per mg di proteina (fornendo SSA come substrato) varia tra 47,6% e 86,7% rispetto alla forma più comune dell'enzima (100%) (Tab. 5). (Blasi et al. 2002)

Exon	SNP (Y11192)	Amino acid substitution (Y11192)	Base position (AL031230)	N of variants/ chromosomes screened	Expressed SSADH enzyme activity ^a
1	c.106G > C	G36R	g.38755	0/20	86.7%
3	c.538C > T	H180Y	g.47015	26/112	82.5%
3	c.545C > T	P182L	g.47022	4/54	47.6%
4	c.709G > T	A273S	g.48621	0/20	65.1%
7	c.1115A > G	N372S	g.66520	0/20	Not tested
8	c.1216G > A	V406I	g.71692	0/26	Not tested
9	c.1389T > C	D463D	g.78817	0/30	Not applicable
	w.t.				100%

Tal. 5 Singole mutazioni polimorfiche della sequenza codificante SSADH con i corrispondenti cambiamenti aminoacidici. Per valutare l'effetto funzionale delle mutazioni, i cDNA del gene modificati per mutagenesi sito specifica sono stati clonati in vettori di espressione e di ciascuno è stata misurata l'attività SSADH. Non tutti gli SNPs sono stati analizzati in vitro (Blasi et al., 2002).

L'attività enzimatica dell'SSADH mostra una grande variabilità nella popolazione umana normale. Nella Figura 23 è riportata la distribuzione complessiva dell'attività enzimatica misurata su linee linfoblastoidi ottenute da: soggetti sani apparentemente non imparentati, pazienti affetti da 4-HBA, genitori e fratelli di affetti. Dai risultati emerge infatti che, mentre nei pazienti non è presente alcuna attività (<5%), nei soggetti sani l'intervallo di variazione è piuttosto ampio e si sovrappone parzialmente a quello dei genitori (eterozigoti) e dei fratelli (eterozigoti o omozigoti normali) degli affetti. Una diminuzione di circa il 50% dell'attività enzimatica, riscontrata nei genitori degli affetti 4-HBA, non sembra tuttavia essere associata a nessun sintomo clinico evidente.

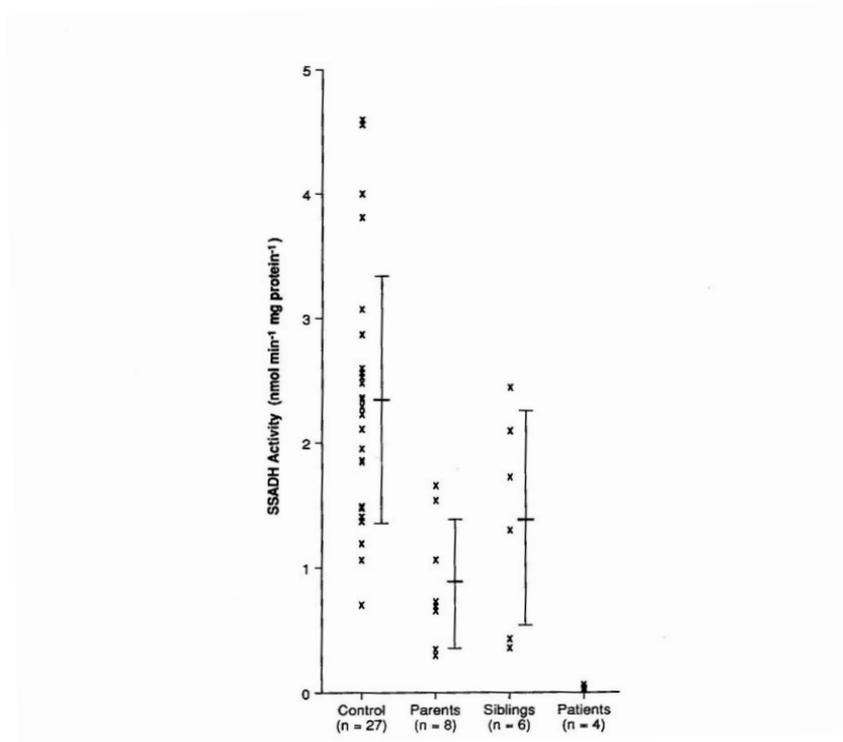


Fig.21 Analisi dell'attività SSADH in linee di linfoblasti provenienti da diversi individui.. Ciascun punto è il valore medio di saggi di attività in 3-6 subculture di una linea linfoblastoide. La barra verticale indica la media di attività SSADH ottenuta in ciascun gruppo di linee linfoblastoidi: controlli, pazienti, genitori e fratelli

2 Lo scopo del lavoro

L'analisi strutturale del gene SSADH, fino ad ora effettuata, ha permesso di caratterizzare tutta la regione codificante del gene individuando le diverse varianti patologiche e non patologiche. E' stata riscontrata la presenza di due diversi trascritti che differiscono per la regione 3' UTR. Inoltre è stata identificata la regione del promotore in cui sono stati individuati elementi regolativi sia positivi che negativi in grado di modulare l'espressione genica.

La ricerca di mutazioni nella regione codificante del gene in individui di diverse popolazioni ha permesso di calcolare la frequenza degli alleli per ciascun sito polimorfico che causano cambiamenti amminoacidi nella proteina.

Da studi precedenti, effettuati dal professor Gibson (1991), nostro collaboratore, è risultato che l'attività enzimatica in un campione di soggetti normali non imparentati presenta un ampio intervallo di variazione.

Dato il ruolo chiave dell'SSADH nel catabolismo del GABA e nella detossificazione dall'accumulo di metaboliti come l'HNE, soprattutto a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC), il lavoro svolto nella tesi ha come scopi:

1. valutare il livello di polimorfismo per le varianti della regione codificante attraverso l'analisi di campioni popolazionistici rappresentativi di tutti i continenti (analisi intra-popolazionistica specifica).

2. individuare lo stato ancestrale e derivato di ogni variante polimorfica attraverso l'analisi di 7 specie di primati non umani (analisi inter-specifica).

3. analizzare le variazioni molecolari del gene sia nella regione codificante che nel promotore, che potrebbero essere responsabili di una quota dell'ampio intervallo di attività enzimatica osservato.

4. confermare l'ipotesi che l'enzima SSADH conferisca un ruolo protettivo contro i differenti prodotti derivati dallo stress ossidativo cellulare attraverso l'overespressione in vitro del gene.

5. realizzare costrutti che esprimono una proteina di fusione costituita dalla regione codificante della forma matura dell'SSADH legata a quella della GST (glutazione S-trasferasi) per poter in seguito caratterizzare biochimicamente le isoforme con le diverse sostituzioni amminoacidiche.

Lo studio della variabilità dell'attività enzimatica e delle variazioni molecolari che ne sono alla base può fornire importanti informazioni sul possibile contributo di tali varianti alla comparsa di alcuni fenotipi neurologici clinici o subclinici. Esse infatti potrebbero essere causa dello

squilibrio nella produzione di GABA e GHB nell'organismo, o determinarne l'incapacità di detossificare metaboliti tossici per il SNC, quali l'HNE.

3 Materiali e metodi

3.1 Creazione e caratterizzazione di costrutti per l'espressione in vitro del gene SSADH

Ricostruzione degli aplotipi della codificante

Per quanto riguarda i dati ottenuti dal sequenziamento intraspecifico umano, le posizioni eterozigoti sono state risolte in modo non ambiguo e ne è stata individuata la fase attraverso studi familiari. La ricostruzione aplotipica degli SNPs è stata ottenuta con il programma PHASE 2 (Stephens et al. 2001) e successivamente analizzata con Arlequin 2.000 (Schneider et al. 1997). Delle 8 combinazioni aplotipiche attese per le posizioni c.106 (G>C), c.538 (C>T) e c.545 (C>T), nella popolazione mondiale ne sono state effettivamente osservate soltanto 3: aplotipo 1 (GCC), aplotipo 4 (GTC) e aplotipo 5 (CTT).

Vettori d'espressione per le varianti della regione codificante

Il vettore d'espressione pcDNA3.1 (Invitrogen) contenente l'intero cDNA di SSADH corrispondente all'aplotipo 1 (GCC) è stato ottenuto come già descritto (Blasi et al. 2002). Per ottenere il clone di cDNA con le altre varianti missense [c.106(C), c.538(T), c.545(T)] corrispondenti agli aplotipi 4 e 5 è stato utilizzato il kit di mutagenesi sito-specifica (Stratagene) e il vettore pcDNA3.1 contenente il cDNA con l'aplotipo 1 come template. I tre costrutti sono stati controllati per verificare l'esattezza della regione codificante usando BigDye dideoxy terminators, e analizzati con il sequenziatore automatico ABI3100 (PE Applied Biosystem) (Blasi et al. 2006b).

Vettore d'espressione usato come controllo negativo

Il vettore d'espressione pCMV-Sport6 contenente la sequenza codificante del gene A2 (AKR7A2; NM_003689;), componente della famiglia delle aldo-cheto reductasi 7 di Homo sapiens è stato acquistato alla RZPD (clone ID: IRATp970C1110D6) e usato come controllo negativo nelle trasfezioni stabili sulla linea cellulare di HEK 293.

Vettori d'espressione per le varianti nella regione del promotore

Il vettore utilizzato nel clonaggio è pGL3 Basic (Promega). Tale vettore contiene il gene per la resistenza all'ampicillina, utilizzata nella selezione dei DNA ricombinanti, ed il gene reporter codificante per la luciferasi privo di promotore. Mediante il clonaggio della regione 5'UTR dell'SSADH (ottenuta per amplificazione di DNA genomico estratto da linfociti di diversi individui) a monte del gene reporter (luciferasi) si può studiare l'attività di trascrizione del promotore del gene in esame.

I primers utilizzati nell'amplificazione di una regione di 0,8 kb al 5'UTR del gene SSADH sono stati sintetizzati in modo da avere alle estremità 5' un corto frammento di DNA (linker) con un sito di taglio per la endonucleasi SacI: SS83SacI (5'-CTAGTATGACTTTGAACGCTA-3') e SSP4SacI (5'-TATAAGAGCTCGGGCAACGACGGCGACAGG-3').

Per l'amplificazione è stato utilizzato l'enzima Taq Pfu HF (Promega). Al termine dell'amplificazione i prodotti di PCR sono stati controllati su gel all'1% d'agarosio e purificati con l'utilizzo di colonnine con una resina specifica. Sia il prodotto di PCR che il plasmide sono stati digeriti con SacI. Per impedire al vettore di richiudersi senza legare l'inserito sono stati eliminati tramite la fosfatasi alcalina (Phosphatase alkaline from Calf Intestine, CIP) i gruppi fosfato presenti alle estremità 5' create dalla digestione con l'endonucleasi. La quantità di inserito richiesta per il clonaggio è stata calcolata tenendo conto di un rapporto molare inserito-vettore di 2 a 1 e utilizzando la formula:

$$\text{ng inserito} = (\text{P.M. inserito} \times \text{ng vettore} / \text{P.M. vettore}) \times 2.$$

Per la preparazione dei costrutti si è partiti da un costrutto di espressione di 0,8 kb (precisamente 811bp) derivante da un clone genomico cosmidico (B1212). L'analisi popolazionistica ha permesso di confermare la presenza negli individui della sequenza di questo promotore e si è scelto di lavorare sul DNA di alcuni individui di origine europea (denominati BK) di cui era già stato individuato l'aplotipo codificante. Tra questi sono stati selezionati gli individui che rappresentavano i due tipi di promotore associati all'aplotipo 1 della codificante (BK45 e BK31) e il più frequente tra gli aplotipi del promotore associati all'aplotipo 4 della codificante (BK70).

Creazione di linee cellulari trasfettate in modo stabile e transiente

Le cellule HEK293 (human embryonic kidney) vengono cresciute a 37 °C in terreno Dulbecco modificato Eagle e completo di FBS 10%, L-glutammina (2 mM), penicillina (50 U/ml) e streptomina (50 µg/ml).

Le trasfezioni transienti sulla linea cellulare di HEK293 sono state effettuate usando il reagente JetPEI™ (Polyplus Transfection), secondo le istruzioni del produttore. In breve, 5–10 x 10⁵ cellule sono state piastrate il giorno prima in una piastra da 60mm. Circa 3 µg di ciascun costrutto clonato nel vettore d'espressione insieme a 3µg del plasmide pcDNA 3.1/lacZ (Invitrogen) sono stati uniti al reagente per la trasfezione e aggiunti al terreno di crescita delle cellule, secondo le istruzioni del produttore. Ventiquattro ore dopo, le cellule sono state raccolte, lavate e sono stati ottenuti gli estratti cellulari.

Trasfezioni stabili sono state effettuate sulla linea cellulare di HEK293 con i costrutti d'espressione per l'aplotipo1 di ALDH5A e per il controllo negativo AKR7A2 tramite cacio-fosfato usando circa 10 µg di costrutto per una piastra da 100mm di diametro contenente 10⁶ cellule. Le linee cellulari stabili sono state selezionate aggiungendo al terreno di coltura 0.8 mg/ml G418 per circa due settimane ottenendo così singoli cloni. I cloni che si sono mostrati resistenti alla G418 sono stati isolati e poi espansi.

Estrazione dell'RNA e analisi del Northern blot delle linee cellulari stabili

L'RNA totale è stato isolato da linee cellulari trasfettate stabilmente usando il TRIZOL Reagent (Invitrogen). Per l'analisi tramite Northern blot, l'RNA è stato frazionato su un gel 1% formaldeide-agarosio e trasferito su una membrana Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences).

L'ibridazione è stata effettuata con un prodotto di PCR che copre gli esoni 7-10 della sequenza codificante dell'SSADH: il cDNA SSADH contenuto nel vettore d'espressione pcDNA3.1 è stato amplificato usando i primers S25 (5'-GTTTGCTCAAACCAATTCTTG-3') e L34B (già descritto in Blasi et al. 2000) e in seguito marcato con il metodo del random priming con [α -³²P]dCTP. Il frammento S19 (437bp) è stato ottenuto tramite una doppia digestione con le endonucleasi BamHI and XhoI (Promega) da un vettore pcDNA3 contenente la sequenza codificante di RP S19 (NM_001022) e usato come controllo endogeno. Le condizioni di ibridazione e di lavaggio sono state essenzialmente stabilite in base alle raccomandazioni del produttore. Il livello di [α -³²P]dCTP incorporato è stato determinato tramite PhosphoImager scanning.

Real-time PCR quantitativa (QRT-PCR)

Un µg di RNA totale è stato retrotrascritto a cDNA usando la M-MLV reverse trascrittase (Invitrogen) secondo un protocollo standard che usa l'incorporazione casuale di esameri (100 ng/µl). Le condizioni di incubazione sono state le seguenti: 1.5 h a 37°C e 10' a 70°C. Abbiamo effettuato la QRT-PCR usando il sistema Taqman (Applied Biosystems). Il livello di espressione del gene ALDH5A1 e del riferimento interno (gene GAPDH) sono stati misurati per mezzo di una PCR che usa i prodotti Assay-on-demand™ gene expression marcati con FAM dye (ALDH5A1: Hs00542444) o VIC dye (GAPDH: P/N 4326317E), (Applied Biosystems). La misurazione simultanea dell'espressione di ALDH5A1-FAM/gene di controllo-VIC ha permesso la normalizzazione della quantità di cDNA aggiunto per ogni linea cellulare stabile (campione). Abbiamo effettuato ogni reazione di PCR in triplicato usando la Taqman Universal PCR Master Mix e ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. È stato stabilito un ciclo soglia comparativo (Ct) per determinare l'espressione genica del campione rispetto al riferimento (la linea cellulare HEK293). Quindi, lo stato stabile dei livelli di mRNA è stato espresso come differenza di n-volte rispetto al riferimento. Per ciascun campione, il valore Ct di ALDH5A1 è stato normalizzato usando la formula $DCt = Ct_{ALDH5A1} - Ct_{GAPDH}$. Per determinare i livelli di espressione relativa, è stata usata la formula $DDCt = DCt_{campione} - DCt_{riferimento}$ e il valore usato per rilevare l'espressione genica relativa è stato calcolato usando l'espressione 2^{-DDCt} .

Saggio di attività enzimatica dell'SSADH

Gli estratti cellulari ottenuti dalle linee trasfettate in modo sia stabile che transiente sono stati preparati tramite sonicazione in 100mM Tris-HCl (pH 8.0) e il contenuto proteico è stato determinato con il metodo Bradford. Circa 0.1 mg di estratto cellulare sono stati usati per misurare l'attività SSADH come descritto (Gibson et al. 1991). Ciascun estratto è stato saggiato in triplicato con (campione) e senza (background) SSA come substrato. L'attività, espressa come nmol/min /mg di proteina, è stata ottenuta sottraendo la media dei valori del background dalla media dei valori dei campioni.

Saggio dell'attività della β -galattosidasi

Si utilizzano 5-10 μ g di ciascun estratto, miscelati con 270 μ l di una mix formata da:

- 201 μ l di $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,1M
- 3 μ l soluzione Mg 100 \times
- 66 μ l ONPG 1 \times

Si incuba in un bagnetto termostato a 37 °C per un tempo variabile (massimo 30 minuti), fintanto che si sviluppa nella reazione un colore giallo.

A quel punto la reazione viene fermata aggiungendo a ciascuna provetta 500 μ l di Na_2CO_3 1M.

La colorazione sviluppata durante l'idrolisi dell'ONPG da parte della β -galattosidasi è dovuta alla formazione tra i prodotti della reazione del cromogeno giallo ortonitrofenolato.

In condizioni di eccesso di substrato (ONPG), la quantità di cromogeno prodotto durante la reazione è proporzionale alla quantità di enzima presente nel campione. In questo modo si ottiene la misura dell'attività del gene Lac Z.

L'attività di β -galattosidasi è il risultato della media di tre saggi fatti per ciascuna delle repliche di ogni specifica trasfezione e serve per valutare l'efficienza di trasfezione.

Si legge la O.D. 420nm degli estratti.

Si calcolano le unità di β -galattosidasi, prodotte per μ g di estratto per minuto, attraverso la seguente formula (Sambrook et al., 1989):

$$U\beta\text{-gal} / (\mu\text{g proteina} \times \text{min}) = (\text{O.D.420nm} / 0,0045) / (\mu\text{g di estratto} \times \text{min})$$

3.2 Analisi dell'espressione in vitro delle linee cellulari overesprimenti il gene SSADH

Saggio delle proteine

Il contenuto proteico degli estratti cellulari viene misurato con metodo Bradford.

Il principio del metodo si basa sull'osservazione che l'assorbanza massima di una soluzione acida di Brilliant Blue Coomassie si sposta da 465 a 595 nm, quando si verifica il legame con proteine.

Si miscelano 3 µl di ciascun estratto diluiti in 800 µl di ddH₂O + 200 µl di Biorad Assay Reagent (Biorad) all'interno di cuvette di polistirene a temperatura ambiente e si legge per ciascun estratto la O.D. a 595nm.

Si determina la concentrazione proteica totale utilizzando la formula:
 $\mu\text{g/ml} = (\text{O.D.}_{595\text{nm}}/0,066) / \mu\text{l estratto}$

Saggio dell'attività della luciferasi per il promotore

Si utilizzando 10 µg di ciascun estratto miscelato a 100 µl di Luciferase Assay Reagent (Promega).

L'attività di luciferasi dei costrutti viene misurata leggendo in un luminometro (Perkin Elmer) i conteggi per secondo (cps) prodotti nella reazione luminosa da ciascun estratto.

Il saggio viene ripetuto tre volte per ciascuna replica di ogni singola trasfezione.

L'attività della luciferasi viene quindi calcolata mediante la formula:

$U \text{ luciferasi} = \text{cps} / (\mu\text{g estratto} \times \text{picomoli DNA trasf.})$

La media dei tre valori di attività di luciferasi viene quindi divisa per quella di β-galattosidasi del vettore pcDNA/Lac cotrasfettato: ciò permette la normalizzazione dei valori ottenuti all'interno dello stesso gruppo di esperimenti. I valori normalizzati dei costrutti con i diversi 5'UTR dell'SSADH si confrontano poi con quelli ottenuti per BK31.

Saggio di citotossicità per linee cellulari stabili

Le cellule sono state cresciute come descritto precedentemente e usate per misurare la citotossicità dell'HNE rispetto all'HNEAcido (Neely et al. 1999).

Per i saggi di citotossicità, il giorno 1, le cellule vengono staccate da una fiasca da 75 cm² con la tripsina. Le cellule vengono lavate, risospese in DMEM privo di siero (Cambrex), e piastrate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 45000 cellule/0.18 mL/pozzetto. Il giorno 2, le cellule vengono esposte a concentrazioni crescenti di HNE o HNEAcido per 4 h e 24 h. L'HNE e l'HNEAcido sono stati diluiti in Hank's balanced salts solution e aggiunti in un volume di 20 µl. Trascorse 4 h, la sopravvivenza cellulare è stata saggiata usando il saggio 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Mosmann 1983). La stessa procedura è stata eseguita dopo 24 h.

Misurazione di HNE e HNEAcido

La misurazione di HNE e HNEAcid è stata effettuata tramite HPLC usando una colonna ODS2 (250 mm x 4.6 mm; Waters Corp.) su un sistema Shimadzu Class VP. Il buffer consiste di 35% acetonitrile (gas chromatography grade, EM Science) in acqua contenente 0.3% (w/v) di acido fosforico ad un tasso di flusso di 1.5 ml/min. Gli UV sono stati rilevati ad una lunghezza di 220 nm per l'HNE e 220 nm o 210 nm per l'HNEAcido. I campioni sono stati preparati con l'aggiunta di acetonitrile ad una concentrazione finale pari a 40%, seguita da una centrifugazione a 13000 g per 10 min per rimuovere eventuali precipitati proteici. Un lavoro preliminare ha mostrato che questa concentrazione di acetonitrile permette un totale recupero di HNE and HNEAcid. Di solito, 40–80 µl of supernatante vengono direttamente iniettati per l'analisi.

3.3 Creazione di costrutti per la purificazione delle varianti della proteina SSADH

Vettori d'espressione per ottenere la proteina ricombinante per le varianti SSADH

Per produrre in vitro la proteina SSADH matura per successivi saggi di caratterizzazione biochimica è stato utilizzato il cDNA del gene SSADH di 1464 bp che rappresenta la forma più comune, con c.538(C) e c. 545(C), corrispondente alla proteina matura (488 aa) priva del peptide di importo mitocondriale. Mediante mutagenesi sito-specifica sono stati realizzati altri due cloni, uno contenente c.538(T) e l'altro contenente entrambi i cambiamenti c.538(T) e C.545(T). Il sistema utilizzato per ottenere i costrutti mutagenizzati è quello della amplificazione del DNA in vitro (PCR) utilizzando per ogni costrutto un primer normale ed uno che contiene al centro della sua sequenza quel particolare nucleotide che deve essere mutato. Il risultato ottenuto è quello di tre costrutti, ciascuno in tre cloni diversi, che differiscono per la presenza di un inserto che per le pos. c.538 e c. 545 ha le seguenti combinazioni nucleotidiche:

- clone con pcDNA –inserto CC (sequenza più comune);
- clone con pcDNA –inserto TC;
- clone con pcDNA –inserto TT.

Il vettore utilizzato per la purificazione della proteina SSADH è pGEX. Tale vettore contiene un gene per la resistenza all'ampicillina; contiene un promotore *tac*, inducibile con isopropil β -D tiogalattosidasi (IPTG), a monte del gene che codifica per la glutatione S-trasferasi (GST). Nel vettore è stato clonato il cDNA del gene SSADH grazie ad un sito multiplo di clonaggio situato a valle del gene GST in cui si trovano anche i siti di restrizione per BamHI e EcoRI inseriti a monte e a valle del cDNA di SSADH per effettuare il clonaggio. Mediante l'induzione dell'espressione di una proteina ricombinante, è stato possibile purificare la proteina SSADH.

Induzione dell'espressione proteica in colonie batteriche BL21.

Il DNA plasmidico (pGEX+ inserto) viene utilizzato per trasformare cellule batteriche BL21 di E. Coli.

Dopo aver controllato che l'inserto è nel giusto orientamento, si mettono i batteri a crescere in un terreno in cui vengono diluiti in un rapporto di 1:50. Si aggiunge ampicillina ad una concentrazione finale di 50 μ g/ml. Si mettono a 37°C in agitazione fino ad una lettura O.D.₆₀₀ = 0.6.

Raggiunta la giusta O.D., si prelevano 2 ml di batteri da utilizzare poi come controllo di proteina non indotta (PRE-INDOTTO) mentre al resto della coltura viene aggiunto IPTG ad una concentrazione finale di 1 mM.

Si lascia a 25°C in agitazione per 24 ore.

Al termine dell'incubazione, si prelevano 2 ml di coltura indotta (INDOTTO) e si effettua un controllo dell'induzione su un gel 12% poliacrilamide (SDS-PAGE). Una soluzione colorante permette di visualizzare le proteine come bande blu su uno sfondo trasparente.

Purificazione della proteina ricombinante con la GST

I pellet ottenuti dall'induzione di 500 ml di coltura vengono trattati con inibitori delle proteasi e lisati per isolarne il contenuto proteico. La purificazione si effettua tramite una resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare Bio- Sciences AB) che legherà la proteina fusa alla GST. Vengono raccolte le seguenti frazioni: il lisato passato attraverso la colonna ma che non si è legato alla GST; il lisato legato alla resina; e la resina stessa dopo l'eluizione.

La proteina ricombinante, ottenuta dall'induzione con IPTG delle cellule batteriche BL21, può essere purificata eliminando la parte che consente il

legame con la resina (GST). La proteina ricombinante presenta un sito di taglio riconosciuto dalla Trombina bovina, situato tra la proteina SSADH e la proteina GST. Si utilizza una soluzione di Trombina (c.f. 0,08 U/ μ l) in un volume finale pari al volume di resina usato per la purificazione.

Per verificare che la trombina ha effettuato il taglio fra la proteina SSADH e la GST, caricare su gel SDS-PAGE

4 RISULTATI

4.1 Variazione intra- ed inter-specifica della regione codificante

Individuazione dello stato ancestrale e derivato per le varianti della regione codificante e loro fase aplotipica

Un sequenziamento preliminare dell'intera regione codificante di 39 cromosomi di origine italiana ha portato all'identificazione di tre varianti comuni nelle posizioni c.106, c.538 e c.545. La mutazione c.106 G>C risiede nell'esone 1 nella porzione peptidica rimossa dopo l'importo mitocondriale; essa causa una sostituzione di Gly, in posizione 36 della proteina, in Arg.

Entrambe le mutazioni c.538 e c.545, localizzate nell'esone 3, sono delle transizioni C>T; la prima causa una sostituzione del residuo His, in posizione 180 della proteina matura, con Tyr, la seconda una sostituzione del residuo Pro, in posizione 182 della proteina matura, con Leu.

Abbiamo svolto un lavoro di genotipizzazione che ha compreso il pannello di popolazioni fornito da Human Gene Diversity Project (HGDP), molti altri individui europei e l'analisi della loro segregazione in 40 famiglie, per un totale di 1574 soggetti di 60 popolazioni provenienti da cinque continenti.

Grazie all'utilizzo del programma PHASE, abbiamo risolto in modo non ambiguo la fase degli alleli per le tre posizioni. (Tab.6). L'allele C per la posizione c.106 e l'allele T per la posizione c.538 risultano fortemente associati e si trovano sempre in *cis*. Degli 8 aplotipi attesi, ne sono stati trovati solo 3.

APLOTIPO	POSIZIONE		
	c.106	c.538	c.545
	G36R	H180Y	P182L
	G>C	C>T	C>T
ref in GenBank	G	C	C
1	G	C	C
4	G	T	C
5	C	T	T

Tabella 6 Tre aplotipi riscontrati nella popolazione umana.

L'aplotipo 1 mostra una sequenza uguale a quella presente in banca dati; l'aplotipo 4 presenta la sostituzione nucleotidica in posizione c.538; l'aplotipo 5 presenta sostituzioni in tutte e tre le posizioni.

Il confronto con le sequenze della regione codificante di 7 primati non umani (scimpanzè, bonobo, gorilla, due diverse specie di orango, gibbono e macaca) ha permesso di determinare lo stato ancestrale per ciascuna delle tre posizioni varianti (Tab.7).

Si può notare che alla posizione c.538 l'allele di gran lunga più comune nella maggior parte delle popolazioni umane è quello derivato (C) ad eccezione delle popolazioni dell'Africa sub-Sahariana. Tale distribuzione geografica degli alleli della posizione c.538 è schematizzata nel planisfero in Figura 22 (Blasi-Palmerio et al. 2006; Leone et al.2006).

Posizione	Stato	Allele	Italia (n=214)	UK (n=38)	Nigeria (n=58)	Africa Sub - Sahariana (n=122)	Asia (n=172)
c.106 g.38755	Anc.	G	0.963 ± 0.013	0.921 ± 0.044	0.983 ± 0.017	0.975 ± 0.014	0.948 ± 0.017
	Der.	C	0.037 ± 0.013	0.079 ± 0.044	0.017 ± 0.017	0.025 ± 0.014	0.052 ± 0.017
c.538 g.47015	Anc.	T	0.238 ± 0.029	0.395 ± 0.080	0.379 ± 0.064	0.492 ± 0.045	0.157 ± 0.028
	Der.	C	0.762 ± 0.029	0.605 ± 0.080	0.621 ± 0.064	0.508 ± 0.045	0.843 ± 0.028
c.545 g.47022	Anc.	C	0.963 ± 0.013	0.921 ± 0.044	0.983 ± 0.017	0.975 ± 0.014	0.948 ± 0.017
	Der.	T	0.037 ± 0.013	0.079 ± 0.044	0.017 ± 0.017	0.025 ± 0.014	0.052 ± 0.017

Tabella 7 Frequenze relative (\pm ES) degli alleli per le tre posizioni polimorfiche analizzate in un campione di cinque popolazioni derivanti da tre continenti tramite genotipizzazione (i numeri tra parentesi si riferiscono alle copie alleliche).

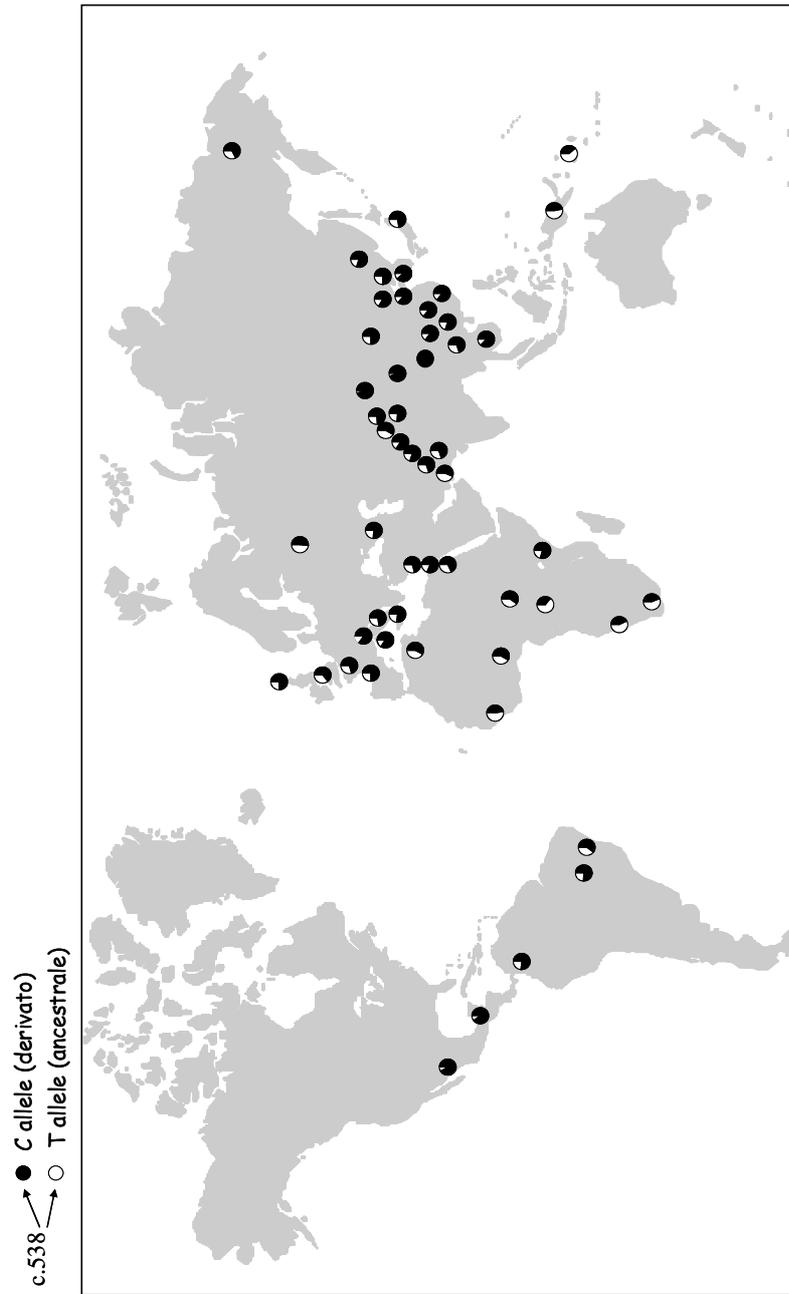


Fig.22 Distribuzione degli alleli c.538 (T) e (C) in 60 popolazioni di cinque continenti diversi

Espressione dell'enzima SSADH in linee cellulari trasfettate transientemente con le varianti della sequenza codificante

In questo studio abbiamo confermato i risultati ottenuti in un lavoro precedente (Blasi et al. 2002) per gli aplotipi 1 e 4 ed abbiamo ottenuto nuovi dati per l'aplotipo 5, con le 3 sostituzioni amminoacidiche (Tab.8). Tre transfezioni transienti sono state effettuate per saggiare l'attività di SSADH su due diversi substrati SSA e HNE.

Sul substrato SSA, l'attività SSADH era 31.9 ± 0.6 , 19.76 ± 4.73 e 7.25 ± 1.74 nmol/min/mg di proteina per gli aplotipi 1, 4 e 5, rispettivamente. Quando si esprime l'attività SSADH degli aplotipi 4 e 5 come percentuale dell'aplotipo 1 (100%), esse producono,rispettivamente, il 62% e 23% dell'attività. Il risultato per l'aplotipo 4, che porta una singola sostituzione amminoacidica, è in buon accordo con i nostri dati precedenti, per quanto riguarda la percentuale di attività dell'enzima rispetto all'aplotipo 1. D'altra parte, l'espressione in vitro dell'aplotipo 5, associata alle 3 sostituzioni amminoacidiche, ha prodotto nuovi dati sull'attività SSADH che è risultata fortemente ridotta.

Sul substrato HNE, l'attività SSADH era, rispettivamente, 32.45 ± 13.57 (100%), 23.43 ± 5.3 (72%), 8.01 ± 0.34 (25%), 5.57 ± 1.42 nmol/min/mg di proteina per gli aplotipi 1, 4, 5 e le cellule HEK293 non trasfettate.

Polimorfismi Sostituzioni amminoacidiche	c.106G>C G38R	c.538C>T H180Y	c.545C>T P182L	Attività SSADH	
				substrato ^a SSA	substrato ^b HNE
APLOTIPO					
aplotipo 1	G	C	C	100%	100%
aplotipo 4	G	T	C	62%	72%
aplotipo 5	C	T	T	23%	25%
HEK293 non trasfettate				0	17%

Tabella 8 I dati sono espressi come percentuale per l'attività SSADH dalla media di a) triplicati di due esperimenti *in vitro* e b) triplicati di tre esperimenti *in vitro*.

4.2 Variazione intra-specifica della regione del promotore.

Individuazione delle varianti del promotore associate agli aplotipi della regione codificante

Il sequenziamento di 22 soggetti di origine europea (BK), 35 di origine africana e 40 asiatica, quasi tutti già completamente tipizzati per gli aplotipi della regione codificante, ha portato all'individuazione delle varianti alleliche di 9 siti polimorfici (SNPs) del promotore.

Sono stati al momento identificati 2 aplotipi del promotore associati all'aplotipo 1 della codificante (GCC), 4 all'aplotipo 4 (GTC) (due dei quali, 3 e 4, osservati ciascuno in un solo individuo e perciò considerati rari), 1 all'aplotipo 5 (CTT) (Fig.23).

Per il lavoro di caratterizzazione del promotore (Blasi et al., 2002) era stato utilizzato un costrutto di espressione di 0,8 kb (precisamente 811bp). Partendo da questo abbiamo realizzato altri costrutti con aplotipi diversi del promotore del gene SSADH, provenienti dal DNA di individui di origine europea denominati BK, inseriti a monte di un gene reporter privo del proprio promotore.

L'analisi popolazionistica ha permesso di confermare la presenza negli individui delle sequenze di questi differenti aplotipi del promotore. Per la scelta delle sequenze promotore da clonare ed esprimere *in vitro* ci si è basati sulla frequenza con cui si presentavano e sulle caratteristiche dell'aplotipo della sequenza codificante a cui erano associati: l'aplotipo rappresentato dall'individuo BK31, è associato all'aplotipo 1 della codificante ed è anche molto comune; quello rappresentato dal soggetto BK45 corrisponde alla sequenza ancestrale ed è comune agli aplotipi 4 e 5 della codificante; l'aplotipo rappresentato dall'individuo BK70 sembra essere associato soltanto all'aplotipo 4 della codificante.

Il soggetto BK45 differisce per il promotore da BK31 per i siti polimorfici g.38942 e g.38349. La sequenza del soggetto BK45 ha lo stesso aplotipo, sia per il promotore che per la regione codificante, di quella presente in banca dati (AL031230) usata come riferimento del gene SSADH.

Il soggetto BK70 differisce per il promotore da BK45 per i siti polimorfici g.38400 e g.38475.

I promotori da clonare sono stati ottenuti per amplificazione del DNA linfocitario di questi due soggetti, BK 45 e BK 70, utilizzando una coppia di primers fiancheggianti la regione di 811 bp con attività di promotore. I

primers includevano all'estremità 5' una sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione SacI. I frammenti amplificati sono stati digeriti con l'enzima di restrizione ed inseriti all'interno del vettore di espressione pGL3, a monte del gene reporter che codifica per la luciferasi (Fig.24). In seguito a trasformazione batterica è stato controllato che i costrutti avessero l'orientamento corretto per la trascrizione del gene reporter, attraverso uno screening per PCR di minicolture delle singole colonie.

Per i cloni risultati positivi allo screening è stata ottenuta una abbondante preparazione di DNA che è stato sottoposto a sequenziamento per verificare che non si fossero aggiunte altre mutazioni durante le fasi di amplificazione e clonaggio.

Analisi funzionale della regione del promotore

Sono state effettuate tre serie di trasfezioni transienti in cui ciascun tipo di promotore (BK70, BK45 e BK31) veniva saggiato insieme ad un controllo per l'attività luciferasica ed uno per l'efficienza di trasfezione.

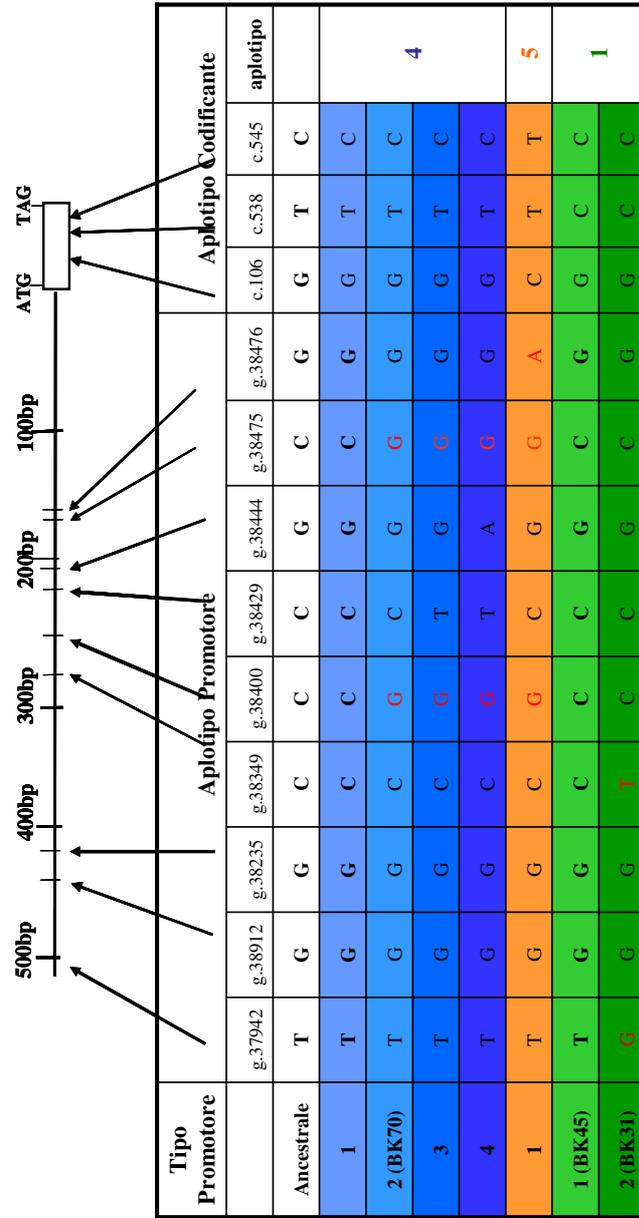


Fig.23 Vengono riportati i vari aplotipi della codificante come descritti nel testo e i diversi aplotipi del promotore ad essi associati. La sequenza ancestrale riportata è quella dello scimpanzé. Le frecce indicano la posizione degli SNPs nel promotore.

	Aplotipi Promotore				Luciferasi Gene
	g.37942	g.38349	g.38400	g.38475	
BK70	T	C	G	G	luciferasi
BK45	T	C	C	C	luciferasi
BK31	G	T	C	C	luciferasi

Fig. 24 Costrutti realizzati in pGL3basic per analizzare l'attività del promotore

Infine, l'attività luciferasica media normalizzata di ciascun BK è stata ulteriormente normalizzata rispetto a quella dello BK31 preso come riferimento.

Entrambi i costrutti BK45 e BK70 hanno espresso un'attività luciferasica minore rispetto a quella di BK31, che è risultata essere la massima attualmente riscontrata.

Mentre l'attività trascrizionale del BK70 è del 56%, quella del BK45 è del 49%. In entrambi i casi c'è una riduzione dell'attività trascrizionale rispetto a BK31 a cui è associato il 100% di attività trascrizionale (Fig.25).

Siccome da un lavoro precedente è stato osservato che la regione considerata ha sia elementi regolativi positivi che negativi, il risultato ottenuto può essere interpretato come una probabile alterazione nel sistema di regolazione trascrizionale. Mentre le posizioni g.38349 e g.38400 si trovano nella sequenza necessaria all'attività del promotore, tra -387 e -184 a monte dell'ATG, la posizione g.38475 è localizzata in una sequenza, tra -184 e -136, che ha una attività promotrice residua.

Non c'è una differenza significativa fra l'attività del promotore BK70 e quella del promotore BK45.

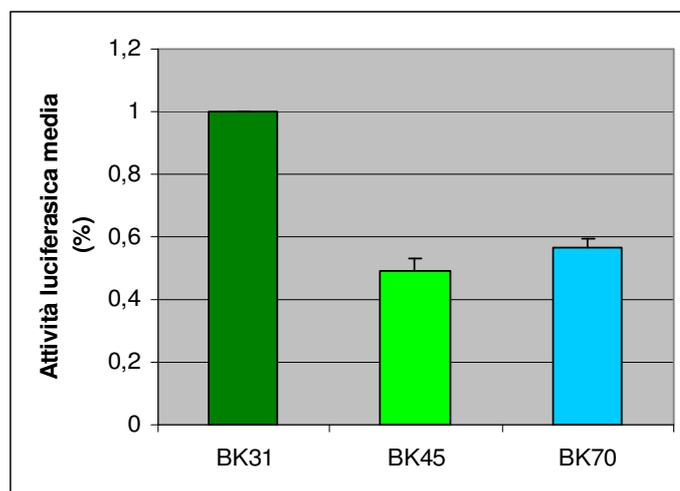


Fig. 25 L'attività luciferasica è espressa in percentuale come media \pm ES da duplicati di tre esperimenti.

4.3 Analisi del possibile ruolo detossificante dell'enzima SSADH tramite la sua overespressione in linee cellulari trasfettate stabilmente.

Ossidazione dell'SSA

Per verificare se SSADH ha un ruolo protettivo nei confronti dei danni ossidativi cellulari, abbiamo trasfettato stabilmente cellule HEK293 con il cDNA di SSADH umano (aplotipo 1), che rappresenta la forma più comune dell'enzima.

Cinque linee cellulari trasfettate stabilmente sono state isolate e caratterizzate per l'espressione del gene e l'attività enzimatica. L'analisi tramite Northern blot e l'ibridazione con un prodotto di PCR che copre gli esoni 7-10 del cDNA di SSADH hanno rivelato che le linee cellulari esprimono tale gene a diversi livelli. L'intensità delle bande è stata valutata e normalizzata tramite l'ibridazione specifica con S19, un piccolo RNA ribosomale ad espressione costitutiva (Fig.26). La quantificazione dell'RNA effettuata per le linee cellulari denominate ALDH5A1-12, -13, -16, -20 e -3 era 2.5, 7, 4, 5 e 100, rispettivamente, quando confrontata con quella di HEK293 non trasfettate. Poiché ALDH5A1-16 ha una quantità di RNA simile a quella di ALDH5A1-20, abbiamo scelto di usare solo ALDH5A1-20 nei saggi successivi.

Per ottenere una più accurata valutazione dell'espressione dell'RNA nelle cellule di HEK293 trasfettate stabilmente, abbiamo saggiato la quantità di RNA di SSADH, normalizzata per i livelli endogeni del gene GAPDH, tramite real time PCR quantitativa (QRT-PCR). La quantificazione dell'RNA ottenuta per le linee ALDH5A1-12, -13, -20 e -3 era 22.7, 72.3, 34.5 ed 394.17, rispettivamente, quando confrontata con le HEK293 non trasfettate (Tab.9 e Fig.27). Questi dati mostrano di avere la stessa progressione di valori precedentemente osservata nel Northern blot.

I profili di attività dell'enzima sono stati ottenuti con SSA come substrato e per le cellule ALDH5A1-12, -13 e -20 erano compresi fra 1.905 e 2.225 nmol NADH/min/mg di proteina. La linea cellulare ALDH5A1-3, invece, ha mostrato la più alta attività (9.5 nmol NADH/min/mg di proteina) (Tab.9). Quando confrontate con HEK293 solo le ALDH5A1-20 sono risultate significativamente differenti.

La differenza nei livelli di RNA tra le diverse linee cellulari rispecchia la differenza riscontrata tra le attività enzimatiche (Fig.27).

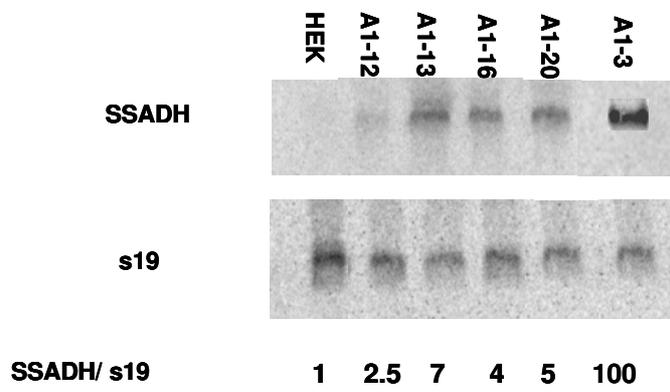


Fig. 26 Northern blot delle linee cellulari trasfettate stabilmente con SSADH.

L'RNA totale (10 ug) estratto dalle cellule HEK non trasfettate e da quelle trasfettate stabilmente con SSADH (A1-12, A1-13, A1-16, A1-20, A1-3) è stato saggiato per l'espressione di SSADH tramite Northern blot, usando uno specifico prodotto di PCR marcato con [α - 32 P]dCTP.

Linea Cellulare	RNA		Attività SSADH
	Northern Blot	QRT-PCR	
HEK293	1	1	0.59 ± 0.049
A1-3	100	394.17 ± 12.69*	9.5 ^a
A1-12	2.5	22.7 ± 3.69*	1.935 ± 0.192
A1-13	7	72.3 ± 12.66*	2.225 ± 0.347
A1-20	5	34.5 ± 6.42*	1.905 ± 0.005*

Tab.9 Con l'analisi del Northern blot e la QRT-PCR si ottiene una quantificazione dell'RNA per ciascuna delle linee cellulari trasfettate rispetto alla linea cellulare non trasfettata. Il risultato ottenuto tramite QRT-PCR è la media di tre esperimenti indipendenti (con ES) normalizzata rispetto al livello di RNA del GADPH.

L'attività SSADH è espressa in nmol NADH/min/mg di proteina come media ± ES da triplicati di due esperimenti in vitro usando SSA come substrato.

^a per questa linea cellulare l'attività deriva da triplicati di un solo esperimento in vitro.

* p < 0.05 quando confrontato con HEK293 non trasfettate.

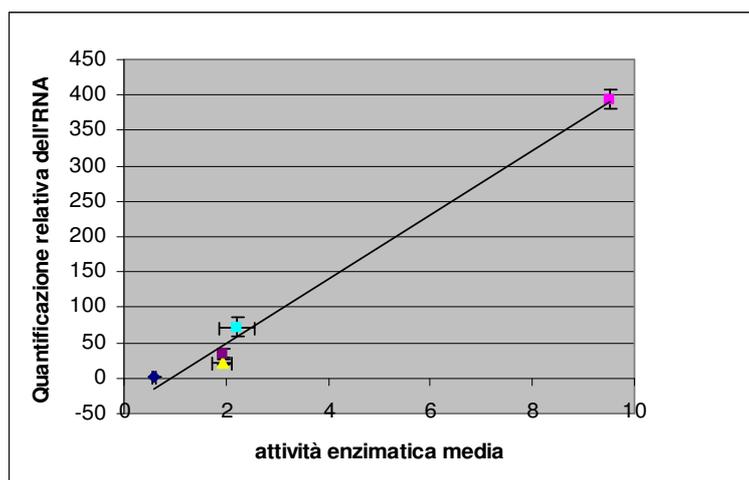


Fig.27 Relazione tra l'attività enzimatica espressa in nmol NADH/min/mg di proteina come media ± SE e la quantificazione dell'RNA con la QRT-PCR delle linee stabili quando confrontate con le HEK293. I colori corrispondono a: blu/HEK; giallo/A-12; viola/A-20; azzurro/A-13; rosa/A-3. A-12 and A-20 hanno mostrato una parziale sovrapposizione. Per le HEK la quantità di RNA è stata arbitrariamente fissata a 1.

Ossidazione di HNE

Per valutare l'attività SSADH su HNE come substrato, abbiamo scelto due linee cellulari trasfettate stabilmente (ALDH5A1-3 = A-3; ALDH5A1-12 = A-12), che rappresentano i due estremi sia per l'espressione del RNA che per l'attività enzimatica. Come controllo negativo dell'espressione dell'SSADH, abbiamo usato la linea cellulare trasfettata stabilmente con AKR7A2 (HEK-AKR7A2 = 7A2). Quest'ultimo enzima riduce l'SSA a gamma-idrossibutirrato e funge da via alternativa per il metabolismo di SSA. I tassi di ossidazione di HNE erano 82.2 ± 3.7 nmol/min/mg nelle cellule A-3 e 38 ± 4 nmol/min/mg nel A-12, mentre un'attività più bassa è stata trovata nelle cellule HEK293 non trasfettate (2.3 ± 0.5 nmol/min/mg) e nelle cellule HEK-AKR7A2 (3.6 ± 0.1 nmol/min/mg) (Fig.28).

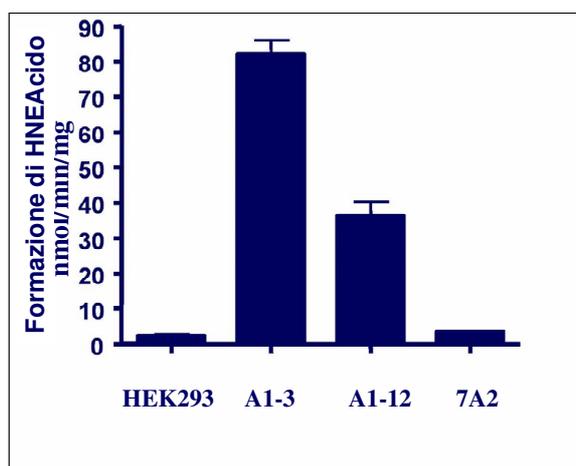


Fig. 28 Capacità dell'SSADH di ossidare l'HNE a HNEAcido. Sono state saggiate le HEK293 non trasfettate, ALDH5A1-3, ALDH5A1-12, AKR7A2 (7A2).

Valutazione di citotossicità indotta da H_2O_2 e dall' HNE

Abbiamo esaminato se le cellule trasfettate stabilmente con SSADH fossero più resistenti all'HNE ed alla tossicità del perossido di idrogeno usando il saggio MTT come misura della sopravvivenza cellulare. L'analisi di MTT misura la capacità della succinil deidrogenasi mitocondriale in cellule viventi di ridurre i sali di tetrazolio al prodotto finale del formazano, fornendo così un'indicazione della crescita e della vitalità delle cellule. Le curve rappresentative di sopravvivenza delle cellule come risposta dose-dipendente sono state ottenute soltanto per la linea stabile A1-3, per le HEK293 non trasfettate e per la linea cellulare HEK-AKR7A2 dopo il trattamento con H_2O_2 e HNE (Fig.29).

I risultati hanno indicato che l'HNE alla concentrazione di 40 μM determina la morte del $93 \pm 3\%$ delle cellule HEK293 e del $94 \pm 4\%$ delle cellule HEK-AKR7A2, mentre il 100% delle cellule A1-3 è sopravvissuto. Il perossido di idrogeno (100 μM) determina la morte del $42 \pm 3\%$ delle cellule HEK293 mentre le cellule A1-3 non sono influenzate.

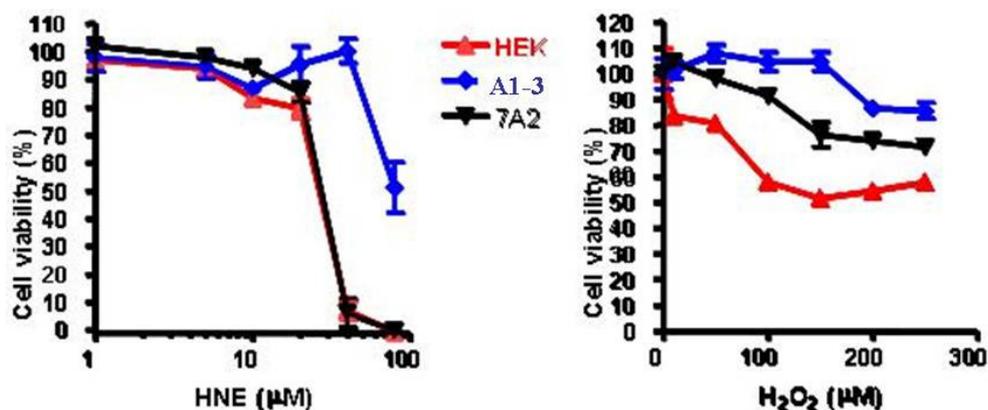


Fig.29 Saggio MTT su cellule HEK293 non trasfettate, ALDH5A1-3, AKR7A2 da esperimenti in triplicato.

4.4 Espressione e purificazione della proteina umana SSADH

Per produrre notevoli quantità di proteina da sottoporre a caratterizzazioni biochimiche è necessario realizzare costrutti con una proteina di fusione e mettere a punto un protocollo specifico di crescita batterica e purificazione proteica.

Per ottenere la proteina SSADH fusa al tag GST (glutazione S- trasferasi) è stato ottimizzato un protocollo di purificazione della proteina ricombinante. A tale scopo il cDNA dell'aplotipo 1 del gene SSADH è stato clonato in un vettore di espressione pGEX a valle del gene GST.

Il cDNA clonato corrisponde a quello della proteina matura, ovvero è privo all'N-terminale dei 47 amminoacidi d'importo mitocondriale, ha al 3' la sequenza di arresto della traduzione ma non quella del sito di poliadenilazione. La sequenza codificante per le posizioni c.538 e c.545 corrisponde al genotipo CC; non è invece inclusa nel costrutto la posizione c.106 che rimane nel peptide d'importo nel mitocondrio.

Il costrutto ottenuto è stato utilizzato per trasformare le cellule batteriche BL21 nelle quali il massimo livello di espressione della proteina ricombinante è stato ottenuto inducendo 500 ml di coltura batterica con 1mM di IPTG a 25 °C per 24 ore.

Per controllare che fosse avvenuta l'induzione, l'estratto proteico delle BL21, prima e dopo l'aggiunta di IPTG, è stato esaminato mediante SDS-PAGE usando il colorante Blue di Coomassie per visualizzare le proteine (Fig. 30A).

La proteina di fusione, con un peso molecolare di 71-73 kDa (dato da 45kDa dell'SSADH e 26 kDa della GST), è stata purificata dall'estratto proteico totale usando la resina Glutathione Sepharose 4B. Sul gel SDS-PAGE è stato esaminato il legame della proteina ricombinante alla resina e la purificazione dall'estratto totale (Fig.30B)

Dopo aver ottenuto, sia qualitativamente che quantitativamente, una buona resa della proteina ricombinante, il passo successivo è stato quello di separare la GST dalla proteina SSADH mediante digestione per 24 ore a 25 °C con la proteasi Trombina.

Dalla digestione risulta che tutta la proteina SSADH viene separata dalla GST, ma non tutta viene eluita dalla resina (Fig. 30C).

Il protocollo realizzato permette, al momento, di purificare una quantità di proteina senza GST pari a 800 ng/ μ l, anche se l'analisi SDS-PAGE

mostra che buona parte della proteina digerita rimane ancora intrappolata nella resina per una condizione ancora non ottimale di eluizione.

La realizzazione di costrutti che esprimano la proteina di fusione anche per le varianti con diverse sostituzioni amminoacidiche potrebbe essere utile per fare successivamente una caratterizzazione biochimica di tutte le isoforme della codificante.

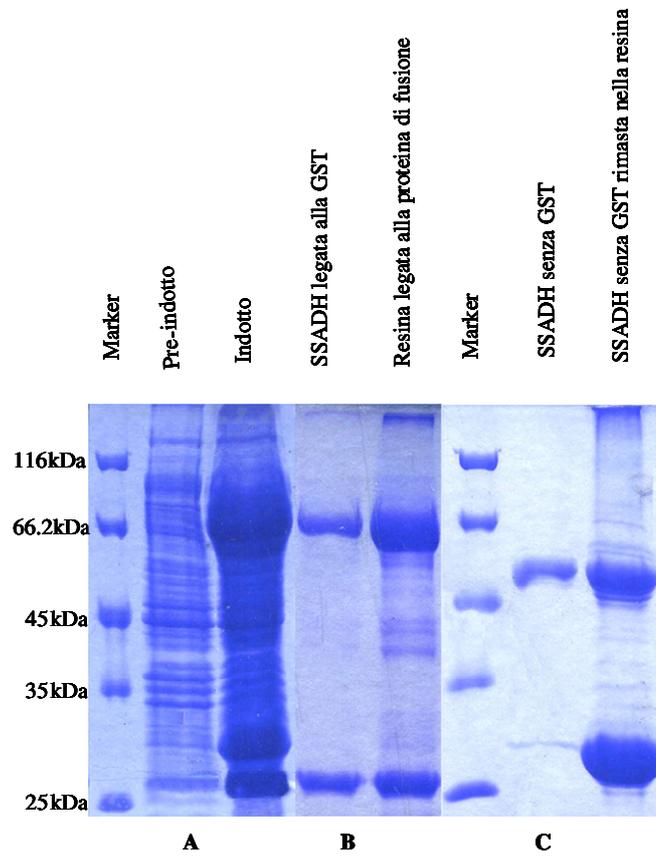


Fig.30 Controllo dell'induzione (A); legame alla resina ed eluizione della proteina ricombinante (B); proteina senza GST (C). A sinistra sono riportati i pesi molecolari corrispondenti a ciascuna banda del marcatore #SM0431.

5 DISCUSSIONE

5.1 Evoluzione del gene SSADH: dati intra ed interspecifici

I dati intraspecifici sono stati ottenuti tramite il sequenziamento delle 811 bp con attività di promotore a monte dell'ATG in individui di popolazioni europee, africane ed asiatiche. Ciò ha permesso di individuare 9 SNPs, ciascuno con due varianti alleliche. La contemporanea caratterizzazione delle posizioni c.106, c.538 e c.545 ha permesso di determinare l'aplotipo della sequenza codificante e l'associazione a ciascun aplotipo del promotore.

I risultati di questo lavoro permettono di costruire un albero filogenetico di tutte le mutazioni fino ad ora identificate nel gene SSADH umano (Fig.31).

Si può osservare che le sequenze ancestrali sia della regione codificante (aplotipo 4 = GTC) che del promotore sono state riscontrate sia in Europa che in Africa; inoltre la comparsa di 5 nuove mutazioni nella regione promotore dell'aplotipo 4, avvenute in tempi diversi, ha determinato la comparsa di 4 rami evolutivi corrispondenti a sequenze del gene SSADH presenti sia in Europa che in Africa. La comparsa della mutazioni nella codificante (che determinano l'aplotipo 5 = CTT) ed una nel promotore hanno portato alla costituzione di una sequenza del gene SSADH riscontrata in Europa, Africa ed Asia; l'assenza di aplotipi intermedi non permette di determinare l'ordine di comparsa di queste mutazioni. Questo aplotipo è al momento associato con un unico promotore in qualsiasi popolazione esaminata.

La comparsa della mutazione c.538 T>C, avvenuta su un cromosoma ancestrale, ha determinato la comparsa di un aplotipo (aplotipo 1 = GCC) che ha raggiunto la frequenza più elevata in tutti i continenti. L'allele c.538 (C) starebbe quindi procedendo verso la fissazione nella popolazione umana per effetto di una recente selezione positiva. E' da notare che all'aplotipo 1 è associata la più alta attività enzimatica riscontrata, e che nella maggior parte dei casi si trova associata ad un promotore caratterizzato dalla massima efficienza nell'attività trascrizionale.

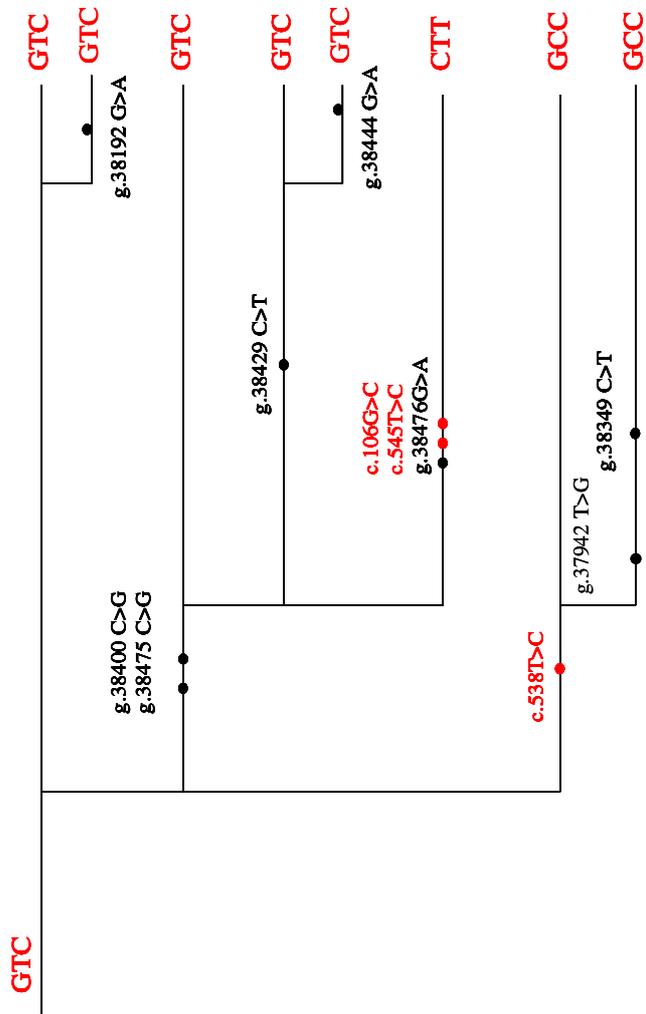


Fig. 31 Albero evolutivo delle mutazioni del promotore (in nero) e della codificante (in rosso) nell'uomo. L'outgroup è rappresentato dalla sequenza riscontrata anche nello scimpanzè.

5.2 Analisi funzionali delle varianti della regione codificante

L'attività enzimatica misurata in vitro da costrutti contenenti gli aplotipi 4 e 5 è risultata essere, rispettivamente, il 62% e il 23% quando confrontata con quella riscontrata nell'aplotipo 1 (100%) (Blasi et al., 2006). Il dato di una attività enzimatica massima associata all'aplotipo 1, caratterizzato dall'allele derivato c.538(C), che è anche il più frequente in tutte le popolazioni mondiali, suggerisce un possibile coinvolgimento dell'SSADH in funzioni cognitive superiori, tipiche della specie umana, come ipotizzato da Plomin e collaboratori (2004).

Inoltre, l'attività SSADH espressa dai tre aplotipi ha mostrato la stessa efficienza quando il substrato era SSA o HNE.

Qui descriviamo, per la prima volta, l'attività dell'enzima associata all'aplotipo 5, che risulta essere drasticamente ridotta (23%). Per una tal diminuzione, supponiamo un meccanismo sinergico generato dall'alterazione biochimica causata dai due cambiamenti degli amminoacidi H180Y per la posizione c.538 e P182L per c.545 nel peptide maturo e un'importazione mitocondriale ridotta dovuto alla variazione G36R dell'amminoacido in posizione c.106 nel peptide di importo mitocondriale.

L'aplotipo 5 mostra frequenze che variano dall'1.7 al 7.9% in tutte le popolazioni umane (Blasi et. al 2006b) ed è stato trovato in stato di omozigosi a basse ma ancora apprezzabili frequenze. Può essere supposto che la ridotta attività dell'enzima connessa con questo aplotipo nella detossificazione potrebbe provocare i possibili fenotipi clinici o subclinici causati dagli aumentati livelli in SNC di SSA, HNE e GHB.

5.3 Analisi funzionale della regione promotore

Lo studio dell'attività enzimatica associata a ciascuna variante della sequenza codificante può in parte rendere conto dell'ampio spettro di variabilità enzimatica riscontrato in individui normali non correlati. Un ulteriore contributo alla variabilità potrebbe essere dovuto a polimorfismi nella sequenza del promotore.

Abbiamo quindi realizzato costrutti con le varianti del promotore riscontrate più frequentemente nella popolazione mondiale (e rappresentate dalle sequenze trovate nei campioni BK70, BK45 e BK31) a monte del gene reporter della luciferasi. Ciò ha permesso di analizzare l'efficienza trascrizionale di tali varianti polimorfiche.

Il BK70 ha la tipologia più frequente di promotore tra quelle individuate per l'aplotipo 4 e mostra una attività trascrizionale del 56% che sarebbe determinata dalle differenze nelle posizioni g. 37942, g.38349, g.38400 e g.38475 rispetto al BK31, a cui è associato il 100% di attività.

Delle due tipologie di promotori individuate per l'aplotipo 1, BK31 ha quella più frequente, mentre BK45 ha quella meno frequente ma che corrisponde alla sequenza ancestrale riscontrata nello scimpanzè. L'attività trascrizionale del promotore BK45 risulta essere del 49% rispetto a quella di BK31 dal quale differisce solo per le due posizioni g.37942 g.38349. Proprio l'allele (T) per la posizione g.37942 e (C) per la g.38349, localizzate nella regione necessaria all'attività di promotore, sembrerebbero responsabili di una riduzione di circa il 50% dell'efficienza trascrizionale riscontrata in BK45.

Il promotore BK70, associato all'aplotipo 4, differisce da BK45, associato all'aplotipo 1, per g.38400 e g.38475. La presenza di un allele (G) in entrambe queste posizioni determinerebbe un lieve incremento dell'attività trascrizionale che diverrebbe il 56% rispetto a BK31.

In conclusione, i dati ottenuti attribuiscono alle posizioni g.37942 e g.38349 una estrema rilevanza nel determinare un'alta efficienza trascrizionale, essendo queste localizzate nella regione necessaria all'attività di promotore. Le posizioni g.38400 e g.38475 sembrerebbero invece coinvolte in un meccanismo di regolazione trascrizionale più fine.

L'analisi dei 3 promotori effettuata in questo lavoro ha evidenziato il ruolo rilevante di alcune posizioni polimorfiche nella determinazione dell'efficienza trascrizionale, ma rimane ancora da chiarire il ruolo degli altri SNP localizzati all'interno della stessa regione. Inoltre è stato evidenziato come i 3 aplotipi della codificante, per i quali era già stata verificata una diversa attività enzimatica in vitro, possano essere associati a diversi tipi di promotore; quelli con una maggiore efficienza possono trovarsi associati ad aplotipi della codificante con una minore attività enzimatica, e viceversa. Uno studio successivo sul promotore associato all'aplotipo 5 (con attività in vitro di circa 23%) potrebbe rivelare due possibili scenari: 1) una elevata efficienza di trascrizione che compenserebbe la riduzione di attività dovuta ai 3 cambiamenti amminoacidici, 2) una diminuita efficienza trascrizionale che determinerebbe un'ulteriore decremento enzimatico.

5.4 Overespressione dell'SSADH: attività e protezione dal danno ossidativo

Le aldeidi sono generate come conseguenza dei normali processi enzimatici e di perossidazione lipidica. Le aldeidi deidrogenasi mitocondriali (ALDHs) detossificano le aldeidi lipido-derivate compreso l'HNE. Nel Sistema Nervoso Centrale, l'HNE ha numerosi effetti sui neuroni e sulla glia attraverso l'alchilazione dei gruppi nucleofili situati su parecchi target cellulari. I livelli di HNE e dei suoi relativi complessi proteici sono elevati nelle malattie neurodegenerative multiple quali la malattia di Alzheimer (AD), la malattia di Parkinson, così come il conseguente danno ischemico e da kainato (Picklo et al. 2001). Gli enzimi mitocondriali ALDH sono implicati nella patogenesi dell'AD.

Dati più recenti (Murphy et al. 2003c) hanno indicato che nelle preparazioni mitocondriali del SNC di ratto, ALDH5A (SSADH) ma non ALDH2 è l'enzima d'ossidazione primario per HNE. Questi risultati dimostrano che le due aldeidi sono entrambe responsabili di ossidazione dell'HNE nel fegato e nell'Sistema Nervoso Centrale, ma contribuiscono in modo differente: SSADH mostra un'attività più alta specifica in mitocondri del SNC e ALDH2 nei mitocondri epatici.

In questo studio, abbiamo prodotto e stabilizzato linee cellulari che esprimono SSADH a vari livelli e le abbiamo usate per analizzare la loro attività enzimatica relativa e, congiuntamente a due modelli differenti di stress ossidativo, per esaminare se e come SSADH può mostrare un ruolo protettivo contro il danno ossidativo.

Le linee cellulari trasfettate stabilmente ALDH5A1-12,-13,-20 e -3 hanno mostrato livelli dell'espressione dell'RNA piuttosto differenti (22.7, 72.3, 34.5 e 394.17 volte più elevati rispetto a quelli delle HEK293 non trasfettate, rispettivamente), ad eccezione delle linee ALDH5A1-12 e -20 che presentano valori più vicini tra loro. Per la linea ALDH5A1-3 ad una maggiore espressione di RNA corrisponde una più elevata attività enzimatica; per le altre linee tale corrispondenza non è così evidente a causa delle minori differenze tra i valori delle attività enzimatiche.

Ciononostante, come mostrato in Figura 27, esiste una diretta proporzionalità tra l'espressione relativa dell'RNA e l'attività enzimatica. Un ulteriore controllo nell'espressione di questo gene potrebbe essere effettuato con l'analisi tramite western blot delle proteine estratte dai mitocondri e dal

compartimento citosolico ibridati con l'anticorpo anti-SSADH di ratto. Inoltre, una valutazione del numero di copie del cDNA di SSADH inserite nel genoma delle differenti linee cellulari potrebbe essere ottenuta da analisi di Southern blot per identificare in modo specifico le copie esogene della sequenza SSADH.

L'attività dell'enzima SSADH delle linee trasfettate stabilmente ALDH5A1-3 e di ALDH5A1-12 è analizzata inoltre su HNE come substrato. I risultati hanno mostrato un aumento significativo nell'ossidazione di HNE per entrambe le linee cellulari (circa 36 e 16 volte, per ALDH5A1-3 e ALDH5A1-12 rispettivamente, quando paragonate a HEK293), con i valori relativamente in conformità con la loro espressione differenziale del RNA.

Abbiamo quindi osservato che l'aumento di attività enzimatica si riscontra sia quando si usa come substrato l'SSA che l'HNE.

Abbiamo poi verificato l'ipotesi che SSADH avesse un ruolo protettivo contro alcuni agenti ossidanti usando la linea cellulare stabile ALDH5A1-3 trattata con differenti concentrazioni di HNE e H₂O₂ e a vari tempi. L'aumento significativo della sopravvivenza delle cellule ha confermato un'efficacia molto alta delle cellule overesprimenti SSADH nella detossificazione.

In conclusione, sulla base dei nostri risultati sulla capacità di SSADH di metabolizzare specificamente SSA e HNE, possiamo supporre che questo enzima protegga le cellule dallo stress ossidativo derivato da processi esogeni ed endogeni. Nelle piante, la rottura del gene codificante per l'*ssadh* porta ai livelli elevati degli intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) connessi con il nanismo e le vaste lesioni necrotiche; le piante transgeniche deficienti di *ssadh* sono influenzate avversamente dallo stress ambientale compresa la prolungata esposizione a luce bianca, UV-B e calore (Fait et al. 2005).

La ridotta capacità detossificante potrebbe essere coinvolta anche nella patofisiologia del modello murino *Aldh5*^{-/-}, come sostenuto dalla riduzione delle difese antiossidanti (Sauer et al. 2006) e probabilmente nella malattia umana corrispondente. Questi risultati suggeriscono che la somministrazione degli antiossidanti dovrebbe essere considerata come terapia ausiliaria per i pazienti, tenendo conto dell'aumentare della durata della vita nei topi trattati con taurina, con note proprietà antiossidanti. La ridotta capacità di detossificazione potrebbe produrre effetti fenotipici minori associati con le varianti comunemente riscontrate negli esseri umani o essere associati ad una gamma di malattie neurodegenerative. Considerando il contributo di SSADH all'attività ossidante del tessuto epatico, l'attività enzimatica delle

varianti potrebbe anche essere implicata in numerose malattie epatiche associate a stress ossidativo endogeno ed esogeno.

5.5 Espressione in vitro della proteina SSADH umana matura

La messa a punto di un protocollo di purificazione della proteina SSADH corrispondente all'aplotipo 1 rende possibile una sua successiva caratterizzazione biochimica, nonché per la proteina derivante dagli aplotipi 4 e 5 della codificante. Tale caratterizzazione prevede saggi di attività su substrati diversi da SSA (ad esempio l'HNE) con la determinazione della K_m , della stabilità a diversi pH, etc.

E' stato infatti recentemente dimostrato un ruolo fondamentale dell'SSADH nella detossificazione nel SNC di metaboliti provenienti dalla perossidazione lipica e da stress ossidativo sia di origine endogena che esogena. La caratterizzazione delle diverse varianti potrebbe rivelare la presenza di genotipi predisponenti a fenotipi clinici o subclinici dovuti ad una ridotta capacità detossificante, nonché ad un accumulo di GHB ed altri composti neuroattivi provenienti dall'alterazione della degradazione del GABA.

6 CONCLUSIONI

Abbiamo studiato l'attività dell'enzima SSADH allo scopo di comprendere l'ampio range di valori riscontrati nella popolazione umana e l'annullamento di tale attività negli individui affetti da 4-HBA, una grave malattia del SNC ereditata in modo autosomico recessivo.

Per raggiungere tale scopo abbiamo suddiviso l'argomento in: studio della variabilità molecolare e funzionale della regione codificante e della regione del promotore.

Abbiamo osservato un'alta variabilità in entrambe le regioni; alcune varianti possono ridurre l'attività enzimatica fino al 50% rispetto a quella dell'aplotipo più comune.

I risultati ottenuti mostrano evidenze in favore di un contributo rilevante da parte di polimorfismi della sequenza promotore, alcuni dei quali specificamente associati a certi aplotipi della regione codificante.

Sulla base dei nostri risultati sulla capacità di SSADH di metabolizzare specificamente SSA e HNE, possiamo supporre che questo enzima protegga le cellule dallo stress ossidativo derivato da processi esogeni ed endogeni.

Non è ancora chiaro se alcune delle varianti che determinano una riduzione dell'attività enzimatica possano essere associate a fenotipi subclinici dovuti all'accumulo, nel cervello, di composti endogeni e tossici per l'SNC quali GABA, GHB e HNE.

Bibliografia

Akaboshi, S., Hogema, B.M., Novelletto, A., Malaspina, P., Salomons, G.S., Maropoulos, D.G., Jakobs, C., Grompe, M., and Gibson, M. (2003) Mutational spectrum of the succinate semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A1) gene and functional analysis of 27 novel disease-causing mutations in patients with SSADH deficiency. *Hum. Mutat.* *6*, 442–450.

Blasi, P., Boyl, P.P., Ledda, M., Novelletto, A., Gibson, K.M., Jakobs, C., Hogema, B., Akaboshi, S., Loreni, F., and Malaspina, P. (2002). Structure of human succinic semialdehyde dehydrogenase gene: identification of promoter region and alternatively processed isoforms. *Mol. Genet. and Metab.* *76*, 348–362.

Blasi, P., Palmiero, F., Aiello, A., Rocchi, M., Malaspina, P., and Novelletto, A. (2006). SSADH Variation in Primates: Intra- and Interspecific Data on a Gene with a Potential Role in Human Cognitive Functions. *J. Mol. Evol.* *63*, 54–68.

Blasi, P., Palmerio, F., Caldarola, S., Rizzo, C., Carrozzo, R., Gibson, K.M., Novelletto, A., Deodato, F., Cappa, M., Dionisi-Vici, C., and Malaspina, P. (2006). Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: clinical, biochemical and molecular characterization of a new patient with severe phenotype and a novel mutation. *Clin. Genet.* *69*, 294–296.

Bouchè, N., Fait, A., Bouchez, D., Møller, S.G., and Fromm, H. (2003). Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 6843–6848.

Breitkreuz, K.E., and Shelp, B.J., (1995). Subcellular distribution of the 4-aminobutyrate shunt in developing soybean cotyledon protoplast. *Plant. Physiol.* *108*, 99-103.

Busch, K., and Fromm, H., (1999) Plant Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Cloning, Purification, Localization in Mitochondria and Regulation by Adenine Nucleotides. *Plant Physiol.* *121*, 589-597.

Buzzi, A., Ying, W., Frantseva, M.V., Velazquez Perez, L.J., Cortez, M.A., Liu, C.C., Shen, Q.L., Gibson, K.M., and Snead III, O.C. (2006). Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency: GABA_B receptor-mediated function. *Brain. Res.* 1090, 15-22.

Chambliss, K.L., and Gibson, K.M. (1992) Succinic Semialdehyde dehydrogenase from mammalian brain: subunit analysis using polyclonal Antiserum. *Int. J. Biochem.* 24, 1493-1499.

Chambliss, K.L., Caudle, D.L., Hinson, D.D., Moomaw, C.R., Slaughter, C.A.A., Jakobs, C., and Gibson, K.M. (1995) Molecular Cloning of the mature Nad⁺ dependent Succinic Semialdehyde Dehydrogenase from Rat and Human: cDNA isolation, evolutionary homology and tissue expression. *J. Biol. Chem.* 270, 461-467.

Chambliss, K. L., Hinson, D.D., Trettel, F., Malaspina, P., Novelletto, A., Jakobs, C., and Gibson, K. (1998) Two exon skipping mutations as the molecular basis of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric Aciduria). *Am. J. Hum. Genet.* 63, 399-408.

Dervent, A., Gibson, K.M., Pearl, P.L., Salomons, G.S., Jakobs, C., and Yalcinkay, C. (2004). Photosensitive absence epilepsy with myoclonias and heterozygosity for succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency. *Clin. Neurophysiol.* 115, 1417-1422.

Dwivedi, S., Sharma, A., Patrick, B., Sharma, R., Awasthi, Y.C., (2007) Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling, *Redox Rep.*;12(1),4-10. Review

Eriksson, C.J. (2001). The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25,15S-32S.

Fait, A., Yellin, A., and Fromm, H. (2005). GABA shunt and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from Arabidopsis mutants. *FEBSV Lett.* 579, 415-420.

Feldmann, R., and Weiner, H. (1972). Horse liver aldehyde dehydrogenase isolation, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* *247*, 260-266.

Feng, D.F., Cho, G., and Doolittle, R.F. (1997). Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 13028-13033.

Gibson, K.M., Lee, C.F., Chamliiss, L.K., Kamali, V., Francois, B.; Jaeken, J., and Jakobs, C. (1991). 4-Hydroxybutyric aciduria: application of a fluorometric assay to the determination of succinic semialdehyde dehydrogenase activity in extracts of cultured human lymphoblasts. *Clin. Chim. Acta* *196*, 219-222.

Gibson, K.M., Hoffmann, G.F., Hodson, A.K., Bottiglier, T., and Jakobs, C. (1998). 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuroped.* *29*, 14-22.

Gibson, K. M. (2005). Gamma-hydroxybutyric aciduria: A biochemist's education from a heritable disorder of GABA metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* *28*, 247-265.

Gonzalez, F.J., and Nebert, D.W. (1990). Evolution of the P-450 gene superfamily: animal plant "warefare": molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* *6*, 182-186.

Greenfield, N.J., and Pietrusko, R. (1977). Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochem. Biophys. Acta.* *483*, 35-45.

Gropman, A. (2003). Vigabatrin and Newer Interventions in Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency. *Ann. Neurol.* *54*, S66-S72.

Hempel, J., von Bahr-Lindstrom, H., and Jornvall, H. (1984). Aldehyde Dehydrogenase from human liver: primary structure of the cytoplasmic enzyme. *Eur. J. Biochem.* *141*, 21-35.

Hempel, J., Nicholas, H., and Lindahl, R. (1993). Aldehyde Dehydrogenases: Widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci.* 2, 1890-1900.

Hogema, B. M., Gupta, M., Senephansiri, H., Burlingame, T. G., Taylor, M., Jakobs, C., Schutgens, R.B.H., Froestl, W., Snead, O.C., Diaz Arrastia, R., Bottiglieri, T., Grompe, M., and Gibson, M.K. (2001) Pharmacologic rescue of lethal seizures in mice deficient in succinate semialdehyde dehydrogenase. *Nat. Genet.* 29, 212-216.

Jakobs, C., Bojasch, M., and Monch, E., Siemes, H., and Hanefeld, F. (1981). Urinary excretion of gamma-hydroxybutyric acid in a patient with neurological abnormalities: the probability of a new inborn error of metabolism. *Clin. Chim. Acta* 111, 169–178.

Jester, J.V., Moller-Pedersen, T., Huang, J., Sax, C.M., Kays, W.T., Cavangh, H.D., Petroll, W.M., Piatigorsky, J. (1999) The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins', *J Cell Sci.* 112, 613-22.

Kamino, K., Nagasaka, K., Imagawa, M., Yamamoto, H., Yoneda, H., Ueki, A., Kitamura, S., Namekata, K., Miki, T. and Ohta, S. (2000). Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population, *Biochem Biophys Res Commun* 24, 273(1),192-6

Kang, J.H., Park, Y.B., Huh, L.T., Lee, H.W., Choi, S.M., and Kwon, O.S. (2005). High-level expression and characterization of the recombinant enzyme, and tissue distribution of human succinic semialdehyde dehydrogenase. *Protein Exp. Purif.* 44, 16–22

Knerr, I., Pearl, P.L., Bottiglieri, T., Snead, O.C., Jakobs, C., and Gibson, K.M. (2007). Therapeutic concepts in succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH; ALDH5a1) deficiency (γ -hydroxybutyric aciduria). Hypotheses evolved from 25 years of patient evaluation, studies in *Aldh5a1*^{-/-} mice and characterization of γ -hydroxybutyric acid pharmacology. *J Inherit. Metab. Dis.* 30, 279-294

Knight, L.P., Primiano, T., Groopman, J.D., Kensler, T.W., and Sutter, T.R. (1999). cDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B1-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis* 20, 1215-1223.

Knoll, A.H. (1992). The early evolution of eukariotes: a geological perspective. *Science* 256, 622-627.

Lassen, N., Pappa, A., Black, W.J., Jester, J.V., Day, B.J., Min, E., Vasiliou, V., (2006) Antioxidant function of corneal ALDH3A1 in cultured stromal fibroblasts, *Free Radic Biol Med.* 41(9), 1459-69.

Lemes, A., Blasi, P., Gonzales, G., Russi, M.E., Quadrelli, R., Novelletto, A., and Malaspina, P. (2006). Succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency: Molecular analysis in a South American family. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 587-588.

Leone, O., Blasi, P., Palmerio, F., Kozlov, A.I., Malaspina, P., and Novelletto, A. (2006). A human derived SSADH coding variant is replacing the ancestral allele shared with primates. *Ann. Hum. Biol.* 33, 593-603.

Liu, Z.J., Sun, Y.J., Chung, Y.J., Hsiao, C.D., Chang, W.R., Kuo, I., Perozich, I., Lindahl, R., Hempel, J., and Wang, B.C. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD⁺ and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* 4, 317-326.

Lorenz, S., Heils, A., Taylor, K.P., Gehrman, A., Muhlec, H., Gresch, M., Becker, T., Tauer, U., Stephani, U., and Sander, T. (2006). Candidate gene analysis of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (ALDH5A1) in patients with idiopathic generalized epilepsy and photosensitivity. *Neurosci. Lett.* 397, 234-239.

Malaspina, P., Roetto, A., Trettel, F., Jodice, C., Blasi, P., Frontali, M., Carella, M., Franco, B., Camaschella, C., and Novelletto, A. (1996). Construction of a YAC Contig Covering Human Chromosome 6p22. *Genomics* 36, 399-407.

Metzger, E., and Halpern, Y.S. (1990). In vivo cloning and characterization of the gabCTDP gene cluster of Escherichia Coli K-12. *J. Bacteriol.* 172, 3250-3256.

Mitchell, D.Y., Petersen, D.R. (1987) The oxidation of alpha-beta unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde dehydrogenases. *Toxicol Appl Pharmacol.* 87(3), 403-10.

Moore, S.A., and Baker, H.M., Blythe, T.J., Kitson, K.E., Kitson, T.M., and Baker, E.M. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the bases for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenase. *Structure* 6, 1541-1551.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 16;65(1-2), 55-63.

Murphy, T.C., Amarnath, V., Picklo, M.J., (2003a) Oxidation of 4-hydroxynonenal in rat brain slices. *Chem Biol Interact.* 1, 143-144:101-5.

Murphy, T.C., Amarnath, V., and Picklo, M. J. (2003b) Mitochondrial oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal in rat cerebral cortex, *Journal of Neurochemistry* 84, 1313-1321.

Murphy, T.C., Amarnath, V., Gibson, K.M. and Picklo, M. J. (2003c) Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A), *Journal of Neurochemistry* 86, 298-305.

Neely, M.D., Sidell, K.R., Graham, D.G., Montine, T.J. (1999) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *J Neurochem.* 72(6), 2323-33

Ohsawa, I., Nishimaki, K., Yasuda, C., Kamino, K., Ohta, S. (2003). Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells. *J. Neurochem.* 84(5), 1110-1117.

Pearl, L. P., Novotny, E.J., Acosta, M.T., Jakobs, C., and Gibson, K.M. (2003). Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency in Children and Adults. *Ann. Neurol.* *54*, S73–S80.

Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B.C., Lindahl, R., Hempel, J. (1999). Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Prot. Sci.* *8*, 137-146.

Picklo, M.J., Olson, S.J., Hayes, J.D., Markesbery, W.R., and Montine, T.J. (2001). Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. *Brain Res.* *916*, 229-238.

Picklo, M.J., Olson, S.J., Markesbery, W.R., and Montine, T.J. (2001). Expression and activities of aldo- keto oxidoreductases in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *60*, 686-695.

Plomin, R., Turic, D.M., Hill, L., Turic, D.E., Stephens, M., Williams, J., Owen, M.J., and O'Donovan, M.C. (2004). A functional polymorphism in the succinate-semialdehyde dehydrogenase (aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1) gene is associated with cognitive ability. *Mol. Psychiatry* *9*, 582–586.

Reichard, J.F., Vasiliou, V., Petersen, D.R., (2000). Characterization of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in stellate cell lines derived from normal and cirrhotic rat liver. *Biochim Biophys Acta.* *1487*(2-3), 222-32.

Rivera, M.C., and Lake, A. (1992). Evidence that eukariotes and eocyte prokariotes are immediate relatives. *Science* *257*, 74-76.

Ryzlak, M.T., and Pietrusko, R. (1988). Human Brain “high K_m ” aldehyde dehydrogenase: purification, characterization and identification as NAD^+ -dependent succinic semialdehyde dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* *266*, 386-396.

Sauer, S.W., Kolker, S., Hoffman, G.F., Brinkn, H.J., Jakobs, C., Gibson, K.M., and Okun, J.G. (2007). Enzymatic and metabolic evidences for a region specific mitochondrial dysfunction in brain of murine succinic semialdehyde dehydrogenase (*Aldh5a1*^{-/-} mice). *Neurochem. Int.* *50*, 653-659.

Sgaravatti, A.M., Sgarbi, M.B., Testa, C.G., Durigon, K., Pederzoli, C.D., Prestes, C.C., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., and Dutra-Filho, C.S. (2007). γ -Hydroxybutyric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Int.* 50, 564-570.

Snead III, O.C., and Gibson, K. M. (2005). γ -Hydroxybutyric Acid. *N. Engl. J. Med.* 352, 2721-32.

Sophos, N.A., and Vasiliou, V. (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem.-Biol. Interact.* 143-144, 5-22.

Steinmetz, C.G., Xie, P., Weiner, H., and Hurley, T.D. (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5, 701-711.

Tillakartne, N.J.K., Medina-Kauwe, L., and Gibson, K.M. (1995) γ -Aminobutyric (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 11, 4148-4153.

Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, F.K., and Nebert, D.W. (1999). Eukariotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* 9, 421-434.

Vasiliou, V., and Pappa, A. (2000). Polymorphisms of Human Aldehyde Dehydrogenases. *Pharmacology* 61, 192-198.

Vasiliou, V., Pappa, A., and Estey, T. (2004). Role of Human Aldehyde Dehydrogenases in Endobiotic and Xenobiotic Metabolism. *Drug Metab. Rev.* 36, 279-299.

von Bahr-Lindstrom, H., Hempel, J., and Jornvall, H. (1984). The cytoplasmic isoenzyme of horse liver aldehyde dehydrogenase: relationship to the corresponding human isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 141, 37-42.

Wang, C., Zhang, H., Wang, L., and Zang, L. (2006). Succinic semialdehyde couples stress response to quorum-sensing signal decay in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* 62, 45-56.

Yoshida, A., Rzhetsky Hsu, L., and Chang, C. (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* *251*, 549-557.