

C. Bendotti

Geografia molecolare e cellulare della degenerazione del motoneurone

Riassunto Le malattie del motoneurone, una volta considerate come lo stato patologico di una popolazione cellulare omogenea, sono ora riconosciute come l'espressione fenotipica di una serie di processi biologici complessi ed eterogenei che coinvolgono anche altre cellule. Grazie alla scoperta di uno dei geni responsabili della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), la forma più comune delle malattie del motoneurone, e allo sviluppo di modelli sperimentali validi, è notevolmente aumentata la conoscenza dei meccanismi biomolecolari coinvolti nella degenerazione dei motoneuroni. Numerose evidenze indicano che le alterazioni delle funzioni cellulari dei motoneuroni causate dalla presenza del gene mutato della SOD1, associato ad una forma familiare di SLA, convergono su dei meccanismi che possono essere attivati nella SLA sporadica, da altri fattori tossici. Inoltre, la degenerazione dei motoneuroni non è più da considerare come un evento autonomo ma dipendente da un "cross-talk" con le cellule adiacenti gliali che potrebbe essere la causa della propagazione del danno.

Parole chiave Malattie del motoneurone • Eccitotossicità • Mitochondri • Stress ossidativo • Aggregati proteici • Reattività gliale

C. Bendotti (✉)

Dipartimento di Neuroscienze

Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri"

Via Eritrea 62, I-20157 Milano, Italia

e-mail: Bendotti@marionegri.it

Introduzione

La degenerazione dei motoneuroni è una caratteristica neuropatologica di un vasto gruppo di malattie neurodegenerative che si distinguono sotto il profilo clinico e genetico. Queste malattie colpiscono sia l'età infantile che quell'adulto, possono essere sporadiche (come la sclerosi laterale amiotrofica o SLA e le paraparesi spastiche sporadiche) oppure geneticamente determinate (come l'atrofia muscolare spinale o SMA, l'atrofia muscolare spinobulbare o SBMA, la SLA familiare, le paraparesi spastiche ereditarie). La forma più comune delle malattie del motoneurone che colpisce in età adulta è la SLA. La SLA è caratterizzata dalla perdita selettiva dei motoneuroni spinali, bulbari e corticali che porta ad una paralisi motoria progressiva e generalmente alla morte entro 5 anni dalla diagnosi per insufficienza respiratoria. La perdita neuronale è associata all'attivazione gliale e alla presenza di inclusioni ubiquitinate nei corpi cellulari e nei neuriti distrofici dei motoneuroni. La SLA, come molte altre malattie neurodegenerative, è considerata dal punto di vista eziopatogenetico una malattia multifattoriale. L'identificazione di geni mutati associati alle malattie del motoneurone ha segnato un importante passo avanti verso la conoscenza dei meccanismi biomolecolari responsabili della degenerazione dei motoneuroni. Di particolare importanza per la SLA è stata la scoperta, nel 1993, di mutazioni del gene che codifica per l'enzima antiossidante superossido dismutasi Cu/Zn dipendente o SOD1, associate a circa un quinto della SLA familiare. Ad oggi sono state identificate 110 mutazioni sullo stesso gene (www.alsod.org) tutte associate ad un fenotipo patologico e alcune sono state raramente (3–5%) riscontrate anche nella forma sporadica della SLA. Questo ha dato un forte impulso alla ricerca, soprattutto grazie allo sviluppo di nuovi modelli sperimentali cellulari e animali che hanno permesso di investigare le funzioni tossiche della proteina

SOD1 mutata. Il dato più significativo emerso in questo decennio è che la citotossicità della SOD1 mutata è mediata non da una perdita d'attività dell'enzima, ma dall'acquisizione di proprietà tossiche della proteina mutata. Questo risultato è stato messo in evidenza soprattutto dai topi transgenici portatori del gene umano mutato della SOD1 che sviluppano una sindrome neuromuscolare progressiva simile alla SLA, associata alla progressiva perdita dei motoneuroni spinali e bulbari e all'aumentata gliosi reattiva delle regioni colpite dalla malattia.

In quest'articolo sono riportati i principali risultati ottenuti recentemente dallo studio di questi modelli sui meccanismi molecolari intra- e inter-cellulari responsabili della degenerazione dei motoneuroni.

Meccanismi intracellulari nella patogenesi della SLA

Eccitotossicità, stress ossidativo e alterazioni mitocondriali

L'eccitotossicità risultante dalla riduzione della captazione di glutammato negli astrociti, con il suo conseguente accumulo nel microambiente extracellulare, è ancora considerata tra le ipotesi più probabili nella patogenesi della SLA [1]. L'evidenza di una riduzione del trasportatore gliale glutamatergico, EAAT2, nelle aree affette dalla malattia, sia in soggetti con SLA sporadica che nei topi transgenici per la SOD1 mutata, farebbe ipotizzare un meccanismo trasversale importante nella progressione della malattia, sia nelle forme familiari che sporadiche della SLA. La causa della riduzione dei livelli di EAAT2 non è chiara, ma il riscontro di una mutazione del gene che codifica per questo trasportatore in un paziente con SLA sporadica, farebbe pensare ad un fattore di rischio genetico nella malattia. Un altro fattore di rischio associato all'ipotesi dell'eccitotossicità, è l'*editing* differenziale dell'RNA che codifica per una subunità dei recettori AMPA glutamatergici, la GluR2, come riscontrato recentemente in diversi casi di SLA sporadica. I motoneuroni sono particolarmente sensibili all'eccitotossicità mediata dai recettori AMPA, la mancanza della subunità GluR2 rende questo recettore particolarmente permeabile al calcio amplificando la tossicità del glutammato. È interessante che il trattamento con AMPA antagonisti sia in grado di rallentare la malattia nei topi transgenici per la SOD1 mutata, offrendo nuove possibilità terapeutiche per questa malattia.

Lo stimolo eccitotossico induce nei motoneuroni un'eccessiva produzione di radicali liberi dell'ossigeno, come il perossinitrito e/o i radicali idrossilici intracellulari, che determinano uno stato di *stress* ossidativo dannoso per la cellula [2]. Lo *stress* ossidativo è anche una delle ipotesi di tossicità della SOD1 mutata in relazione ad

un'alterata conformazione della proteina e a un più facile accesso al rame, contenuto nel sito catalitico dell'enzima, da parte di alcuni substrati aberranti come il perossinitrito e l'acqua ossigenata. Tali molecole portano, rispettivamente, alla nitrizzazione di proteine e alla perossidazione dei lipidi danneggiando varie componenti cellulari. L'ossido nitrico (NO), da cui deriva il perossinitrito, è una molecola che non solo viene prodotta all'interno del motoneurone per attivazione dell'enzima ossido nitrico sintasi neuronale, ma può entrare liberamente nella cellula quando viene prodotto in eccesso nell'ambiente circostante ad opera delle cellule gliali reattive (astrociti e microglia).

In genere lo *stress* ossidativo si associa ad una disfunzione mitocondriale nella cellula. Uno dei primi segni di patologia nei motoneuroni di alcune linee di topi con SOD1 mutata è il rigonfiamento dei mitocondri, un fenomeno che è stato osservato anche nei terminali di assoni motori di pazienti con la SLA sporadica allo stadio iniziale della malattia. Tali modificazioni si riflettono in una disfunzione dei mitocondri, rilevabile dalla diminuzione dell'attività della catena di trasporto degli elettroni e dalla diminuita sintesi di ATP nel midollo spinale lombare dei topi con SOD1 mutata all'esordio sintomatico della malattia [3]. Due sembrano essere i meccanismi che conducono alla perdita della funzione mitocondriale, e probabilmente anche alle anomalie strutturali; uno è la perdita del potenziale di membrana che altera il traffico del calcio nella matrice mitocondriale; l'altro è l'attivazione del MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) che porterebbe al rigonfiamento del mitocondrio e alla possibile rottura della membrana esterna con liberazione di citocromo C e dei fattori apoptotici (*Apoptosis Inducing Factor*, AIF) e Smac/Diablo nel citosol. Nel citosol il citocromo C, in presenza di Apaf-1, e procaspasi 9 un complesso chiamato "apoptosoma" attiva la caspasi 9, che a sua volta attiva la caspasi 3, il diretto esecutore della morte cellulare. Anche Smac/Diablo, disattivando gli inibitori delle caspasi inducono l'attivazione di caspasi 3, mentre i AIF agirebbero con un meccanismo caspasi indipendente. Nonostante l'espressione di tutti questi fattori apoptotici, il processo di morte cellulare, che avviene nei motoneuroni dei topi transgenici per SOD1 mutata, non si identifica morfologicamente come un'apoptosi. È ipotizzabile, quindi, che un meccanismo alternativo alla classica apoptosi sia coinvolto nella degenerazione neuronale dei topi con SOD1 mutata e forse anche nei pazienti con SLA [4].

Da cosa dipende il danno ai mitocondri? Recentemente è stato dimostrato che SOD1, generalmente considerato un enzima citosolico, può essere trasportato nello spazio intermembrane dei mitocondri quando si trova in forma parzialmente o completamente de-metallata. Quasi tutte le forme mutate della SOD1 hanno una ridotta affinità per i metalli e, una volta entrato nei mitocondri, l'enzima demetallato acquisisce il rame e genera, con i superossidi, delle reazioni tossiche per i mitocondri stessi. Uno studio

recente, nel quale la SOD1 mutata è stata fusa con una proteina fluorescente ed è stata veicolata selettivamente in varie frazioni subcellulari di cellule in coltura, ha dimostrato, in modo diretto, che è soprattutto la SOD1 mutata nei mitocondri a provocare la morte cellulare attraverso un meccanismo caspasi-dipendente [5].

L'alterazione mitocondriale può comunque anche dipendere da stimoli quali l'eccitotossicità, l'eccessivo afflusso di calcio, l'aumento di radicali dell'ossigeno fenomeni che avvengono anche nella SLA sporadica e che possono creare un circolo vizioso nella disfunzione del mitocondrio portando il motoneurone alla morte.

Aggregazione proteica e alterazioni citoscheletriche

La tossicità associata all'accumulo di aggregati proteici intracellulari sta emergendo come una delle maggiori ipotesi patogenetiche nelle malattie dei motoneuroni e più in generale nella neurodegenerazione. Diverse evidenze basate su reperti autoptici, e su modelli sperimentali, indicano il coinvolgimento di questo meccanismo sia nella SLA, che nell'atrofia muscolare spinobulbare [6].

Nella SLA sia sporadica che familiare è tipica la presenza nei motoneuroni e nei loro assoni, di inclusioni filamentose ubiquitinate quali le "skeins-like inclusions" e gli "axonal spheroid". Inclusioni immunoreattive per ubiquitina si riscontrano anche nei topi transgenici per SOD1 mutata, associate all'accumulo di neurofilamenti fosforilati, e questo fenomeno porterebbe ad una disfunzione del trasporto assonale con conseguenze dannose per i neuroni.

Nei pazienti con SLA familiare di tipo SOD1 e nei corrispondenti topi transgenici, l'accumulo di SOD1 in forma insolubile e aggregata sembra essere all'origine della formazione d'inclusioni ialine che si trovano nei motoneuroni. La SOD1 mutata, nel suo stato de-metallato è piuttosto instabile rispetto alla forma *wild type* della proteina, tuttavia, invece di essere degradata subisce modificazioni del *folding* proteico tali da favorire la formazione di complessi proteici insolubili di SOD1 ad alto peso molecolare, e di formare aggregati ubiquitinati. Una parziale inibizione dell'attività del proteasoma, causata da una riduzione di ATP cellulare e/o dall'azione d'ingombro degli aggregati stessi, contribuirebbe al continuo accumulo intracellulare di proteine aberranti ubiquitinate sino a portare alla formazione d'inclusioni filamentose e sferoidi tipici della SLA. La SOD1 mutata è, infatti, in parte degradata dal proteasoma mediante l'azione della dorfina (RING *finger type E3 ubiquitin ligase*), una componente della via di degradazione ubiquitino-proteasoma dipendente. La morfina, inoltre, legandosi alla SOD1 ne impedirebbe la traslocazione nei mitocondri. Così questa proteina riveste un ruolo importante quale fattore endogeno di protezione verso la neurotossicità della SOD1, attraverso una duplice azione: la

prima favorendo la sua degradazione e quindi impedendo l'accumulo degli aggregati intracellulari, la seconda impedendo che la SOD1 entri nel mitocondrio per innescare i processi sopra descritti [7]. La dorfina, in quanto fattore d'ubiquitinazione delle proteine aberranti nel sistema di degradazione del proteasoma, è in grado di legare anche altre proteine come dimostrato dal fatto che essa è presente anche nelle inclusioni ubiquitinate intracellulari di pazienti con SLA sporadica, e questo potrebbe rappresentare un punto di legame nella patogenesi delle due forme, familiare e sporadica, della malattia. Altre proteine in grado di legare la SOD1 mutata inibendo la sua traslocazione nel mitocondrio, sono le chaperonine (Hsp70 e Hsp25). Il loro ruolo nella neurodegenerazione non è chiaro, tuttavia è interessante che l'arimoclonal, un composto che induce l'Hsp, abbia prodotto un significativo miglioramento della progressione della patologia nei topi SOD1G93A [8].

Oltre all'accumulo di aggregati proteici intracellulari, una caratteristica patologica comune a tutte le forme di SLA e ai modelli animali è la disorganizzazione del citoscheletro nei motoneuroni, spesso associata con l'accumulo di neurofilamenti fosforilati (pNF). Le anomalie citoscheletriche possono originare da un'alterata fosforilazione dei NF, attraverso l'attivazione di chinasi intracellulari, ad esempio la p38MAPK, che è fortemente attivata nei motoneuroni dei topi transgenici SOD1G93A e nei tessuti postmortem di SLA sporadica [9]. L'accumulo di pNF può quindi interferire con il trasporto assonale di substrati necessari alla sopravvivenza del motoneurone. Gli aggregati proteici, siano essi d'origine citoscheletrica o derivanti dall'accumulo di proteine aberranti, possono, infine, inibire l'attività del proteasoma provocando un ulteriore accumulo di proteine anomale associato alla formazione d'inclusioni citoplasmatiche e creando anche in questo caso un circolo vizioso che porta alla morte del motoneurone.

Disfunzione del trasporto assonale

Un ridotto trasporto assonale, sia esso anterogrado verso la sinapsi o retrogrado verso il corpo cellulare, può essere devastante per la vitalità dei motoneuroni considerando la lunghezza dei loro assoni. Oltre all'impedimento fisico dato dall'accumulo dei pNF negli assoni, studi recenti hanno dimostrato che la mutazione del gene della dineina, una proteina essenziale al trasporto retrogrado o l'alterazione del complesso dinactina, un attivatore della dineina, nei topi, provoca una lenta e progressiva degenerazione dei motoneuroni [10]. Anche in questo caso si osserva la formazione di aggregati intracellulari nei motoneuroni. Recentemente una mutazione puntiforme della subunità p150 della dinactina è stata riscontrata anche nell'uomo,

associata ad una forma familiare autosomica dominante di atrofia muscolare spinale e bulbare con paralisi delle corde vocali [11]. L'alterazione di questi geni potrebbe quindi essere un altro fattore di rischio per le malattie del motoneurone.

Meccanismi inter-cellulari nella patogenesi della SLA

Cross-talk tra motoneuroni e cellule gliali

Crescenti evidenze indicano che la morte dei motoneuroni non è un processo che coinvolge esclusivamente queste cellule, ma è con tutta probabilità il risultato di una complessa interazione con le cellule ad essi adiacenti, per lo più astrociti e microglia. A sostegno di quest'ipotesi è il fatto che i topi transgenici, che esprimono la SOD1 mutata esclusivamente nei motoneuroni, o solo negli astrociti, non sono in grado di innescare un processo patologico come quello osservato quando l'enzima mutato è espresso in modo ubiquitario.

Gli astrociti e la microglia, anche se non morfologicamente alterati nella fase precoce della malattia, sembrano essere in grado di liberare nel microambiente intorno ai motoneuroni una serie di fattori neurotossici che comprendono le citochine, il glutammato e l'ossido nitrico. In particolare, l'espressione di TNF α , una citochina principalmente secreta da astrociti e microglia nel sistema nervoso centrale (CNS), e del suo recettore, è notevolmente aumentata nel midollo spinale di topi mSOD1 prima della perdita dei motoneuroni e della reattività gliale [12]. Data la varietà d'effetti che il TNF α svolge nel CNS, quali l'alterazione dei livelli e della funzionalità di fattori di crescita, di altre citochine, del glutammato, dei recettori AMPA, della periferina e di un'ampia gamma di secondi messaggeri intracellulari quali la p38MAPK e l'NO, questa citochina si ritiene che abbia un ruolo importante nella eziopatogenesi della SLA. Il TNF α contribuisce, inoltre, al controllo delle risposte immunitarie, e recentemente è stato riportato che l'immunità indotta da ripetute iniezioni di liposaccaride sia la causa di una significativa anticipazione della malattia nei topi mSOD1 [13].

L'NO, il glutammato e i ROS rappresentano dei fattori inter-cellulari fisiologici importanti nel *cross-talk* tra cellule gliali e neuroni, ma in certe condizioni possono diventare dannosi per le cellule più vulnerabili, ad esempio i motoneuroni. Essi, inoltre, possono contribuire alla propagazione del danno neuronale. Un sostegno a quest'ipotesi deriva da studi effettuati su culture miste di motoneuroni e astrociti che dimostrano che i ROS prodotti nei motoneuroni, in risposta ad un'attivazione eccitotossica, inducono un danno ossidativo del trasportatore del glutammato negli astrociti adiacenti. Questo amplificerebbe lo *stress* eccitotossico dei motoneuroni risultando in un

circolo vizioso determinante per la progressione della malattia [14]. L'ipotesi di un *cross-talk* tra cellule gliali e motoneuroni emerge anche da uno studio recente su topi transgenici chimerici tra SOD1 mutata e SOD1 *wild type*, nei quali è stato dimostrato che la SOD1 mutata in cellule non-neuronali adiacenti a motoneuroni privi della proteina mutata, è in grado di indurre in questi ultimi un accumulo di ubiquitina [15].

Conclusioni

Le osservazioni riportate in quest'articolo permettono di dipingere uno scenario piuttosto complesso, ma promettente, verso l'identificazione di fattori patologici comuni, tra SLA sporadica e familiare che aiutino ad identificare potenziali *markers* per una diagnosi precoce della malattia, e possibili bersagli per lo sviluppo di terapie efficaci. In particolare, l'idea che la degenerazione dei motoneuroni non sia da considerare come evento autonomo ma dipenda da un attivo *cross-talk* con le cellule non neuronali adiacenti, probabilmente responsabili della propagazione del danno, sostiene il concetto che la strategia terapeutica debba essere intesa ad agire su vari meccanismi contemporaneamente.

Bibliografia

1. Mennini T, Bendotti C (2003) Excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis: selective vulnerability of motor neurons. In: Ferrarese C, Beal F (eds) Excitotoxicity in neurological disorders: new therapeutic challenge. Kluwer Academic Publishers, pp 217–227
2. Agar J, Durham H (2003) Relevance of oxidative injury in the pathogenesis of motor neuron diseases. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4(4):232–242
3. Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277(33):29626–29633
4. Guegan C, Przedborski S (2003) Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest* 111(2):153–161
5. Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G (2002) Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 277(52):50966–50972
6. Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ (2003) Protein aggregation in motor neuron disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29(6):529–545
7. Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G (2002) Dofin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem* 277(39):36793–36798
8. Kieran D, Kalmar B, Dick JR, Riddoch-Contreras J,

- Burnstock G, Greensmith L (2004) Treatment with arimoclo-mol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med* 10(4):402–405
9. Bendotti C, Atzori C, Piva R, Tortarolo M, Strong MJ, DeBiasi S, Migheli A (2004) Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(2):113–119
 10. Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C et al (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300(5620):808–812
 11. Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH et al (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33(4):455–456
 12. Hensley K, Fedynyshyn J, Ferrell S et al (2003) Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and TNF alpha-modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 14(1):74–80
 13. Nguyen MD, D'Aigle T, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2004) Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 24(6):1340–1349
 14. Rao SD, Weiss JH (2004) Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci* 27(1):17–23
 15. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA et al (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302(5642):113–117