



**UNIVERSITÀ  
POLITECNICA  
DELLE MARCHE**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE  
DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE

Il trimero non nativo SOD<sub>1</sub> è tossico per i motoneuroni in un modello di sclerosi laterale amiotrofica

Nonnative trimer SOD<sub>1</sub> is toxic to motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis

Docente referente:

Prof. SCIRE' ANDREA ANTONINO

Tesi di Laurea di:

DELLA VALLE BIANCA

ANNO ACCADEMICO: 2022-2023

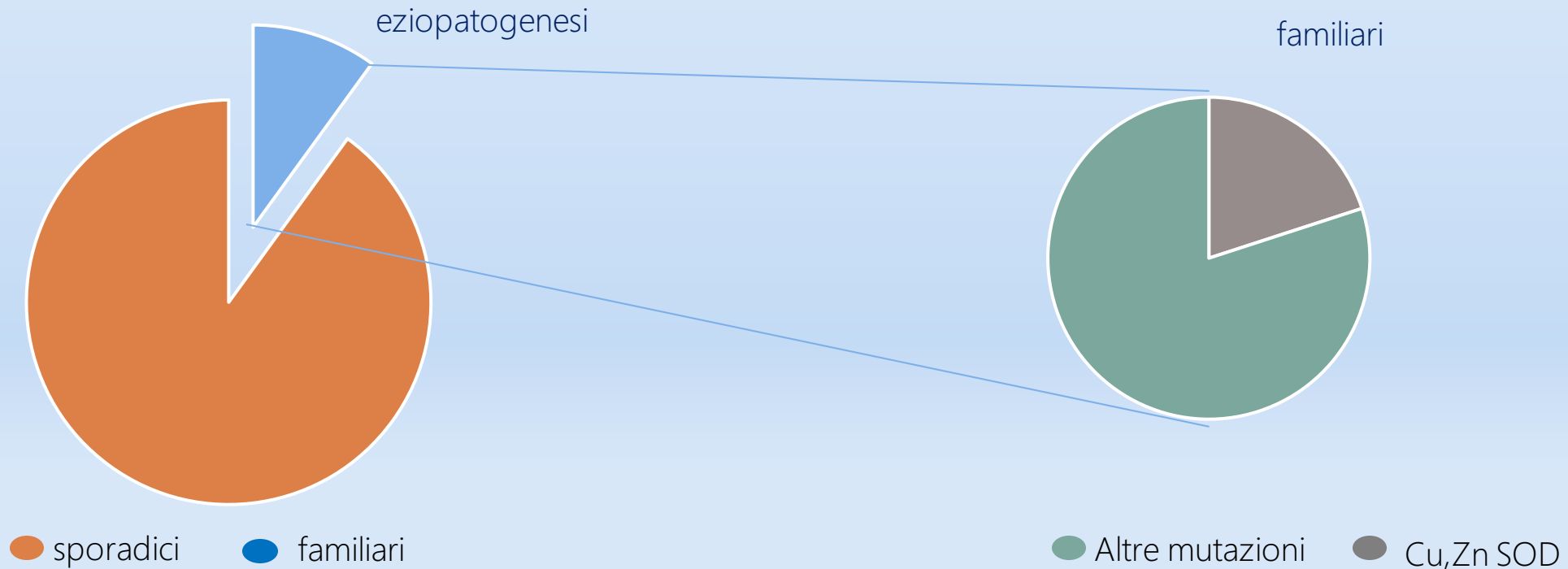
SESSIONE: Febbraio

# **SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA:** Malattia neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni.

Il 90% dei casi sono *sporadici*, il restante

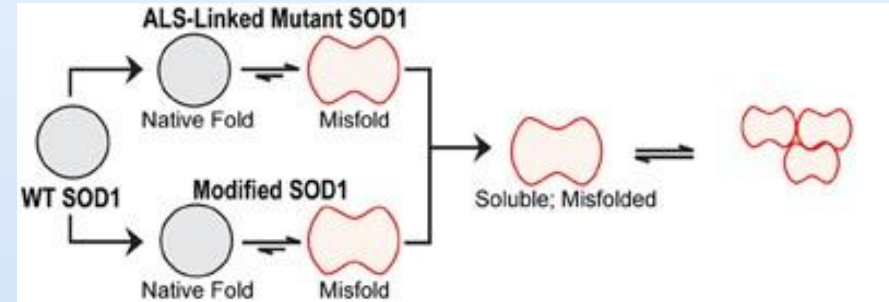
10% **familiari.**

Il 20% riguarda mutazioni nel gene Cu,Zn superossido dismutasi che codifica per l'enzima antiossidante SOD1.



La maggior parte delle malattie neurodegenerative è causata da misfolding ed errata aggregazione delle proteine e recenti studi suggeriscono che le specie citotossiche che causano neurodegenerazione sono oligomeri solubili piuttosto che amiloidi insolubili.

- range dimensionale da due a quattro monomeri;
- contengono un epitopo specifico per SOD1 mal ripiegato, riconosciuto dall'anticorpo C4F6.

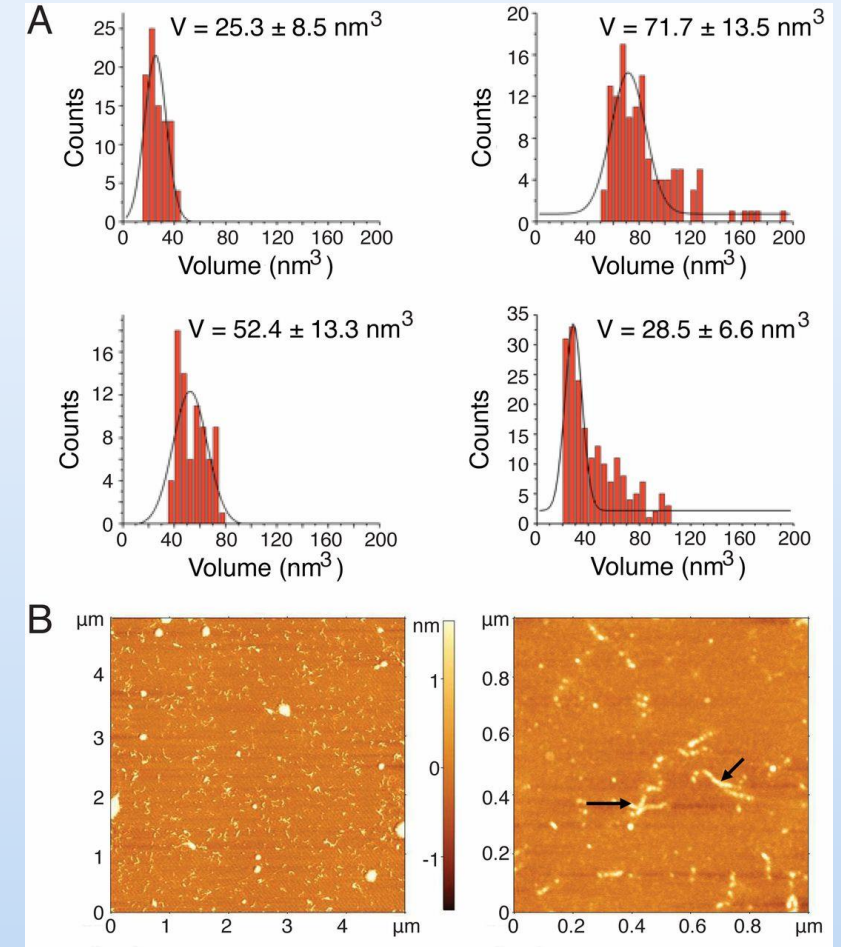
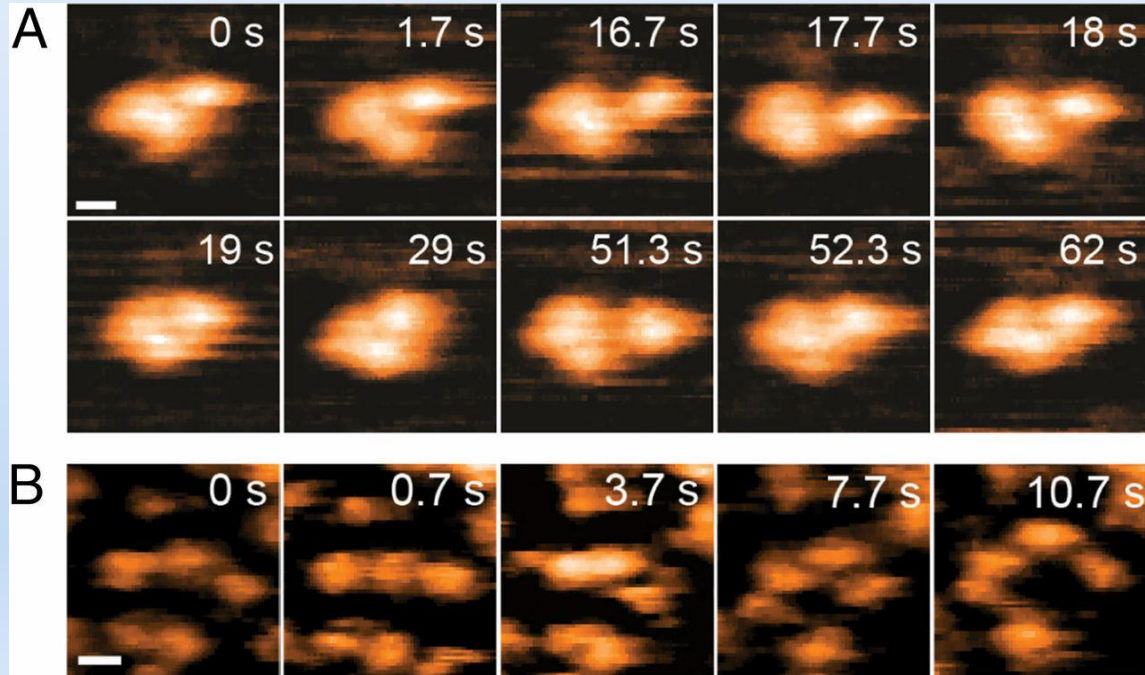


## OBIETTIVO DELLO STUDIO:

delineare e sottolineare come la citotossicità di SOD1 si renda protagonista nella eziopatogenesi della SLA.

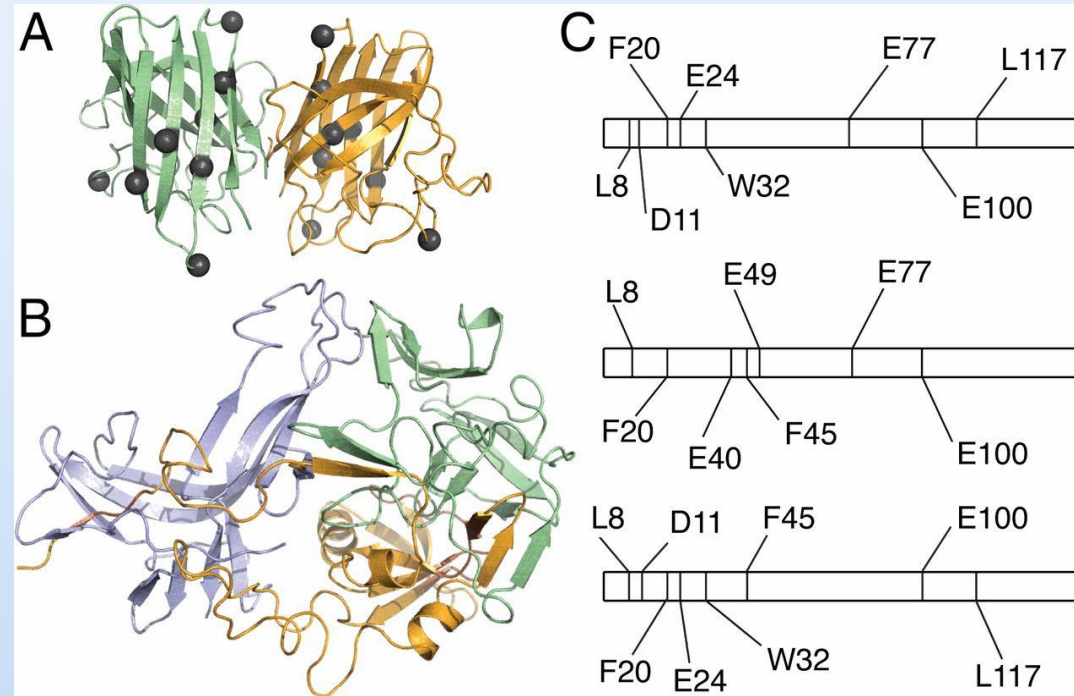
## RISULTATI:

- in condizioni stabilizzanti l'oligomero, quindi a pH 3,5, questo si presenta in una forma trimerica il cui volume è  $\sim 71,7 \text{ nm}^3$ .
- in condizioni destabilizzanti l'oligomero, quindi a pH 7,4, questo risulta principalmente dissociato.



A pH 7,4 la distribuzione del volume dell'oligomero ha un picco a  $28.5 \text{ nm}^3$ , direttamente paragonabile al volume del monomero a pH 3,5, evidenziando la struttura trimerica dell'oligomero.

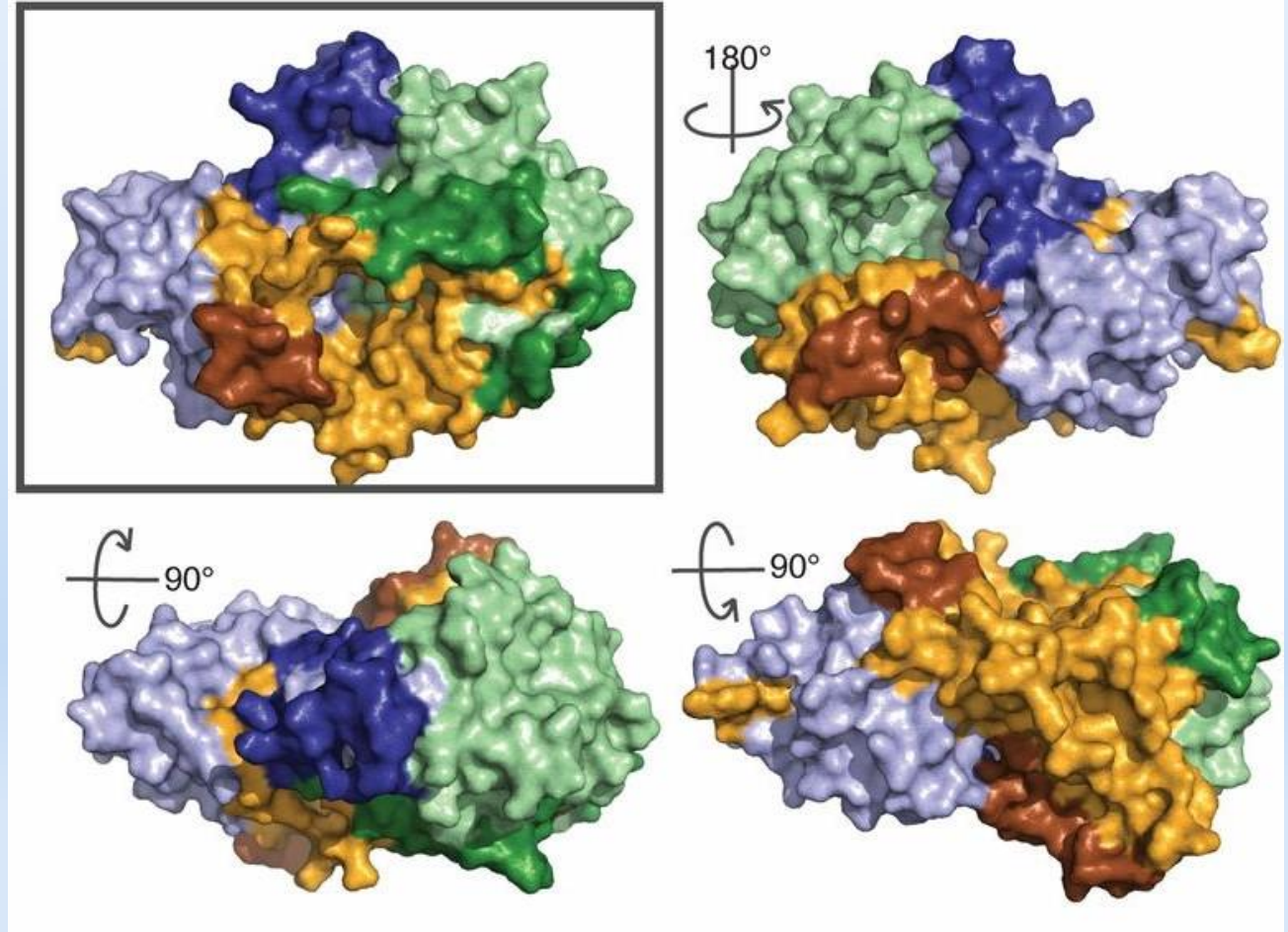
In seguito a proteolisi limitata e MS, sono stati identificati le regioni non strutturate e i siti di tagli del trimero, suggerendo importanti differenze strutturali tra quest'ultimo e il dimerico nativo.



Sulla base dei dati proteolitici ottenuti, il trimero non nativo non deriva dall'aggiunta di un monomero non legato al dimerico nativo, ma prevede la dissociazione di quest'ultimo e l'associazione di monomeri parzialmente ripiegati.



Per caratterizzare il riarrangiamento e ottenere una struttura del trimero, sono state eseguite simulazioni di dinamica molecolare discreta (DMD) di tre monomeri SOD1 separati, applicando un campo di forza tale da ottenere siti proteolitici non strutturati ed esposti al solvente.

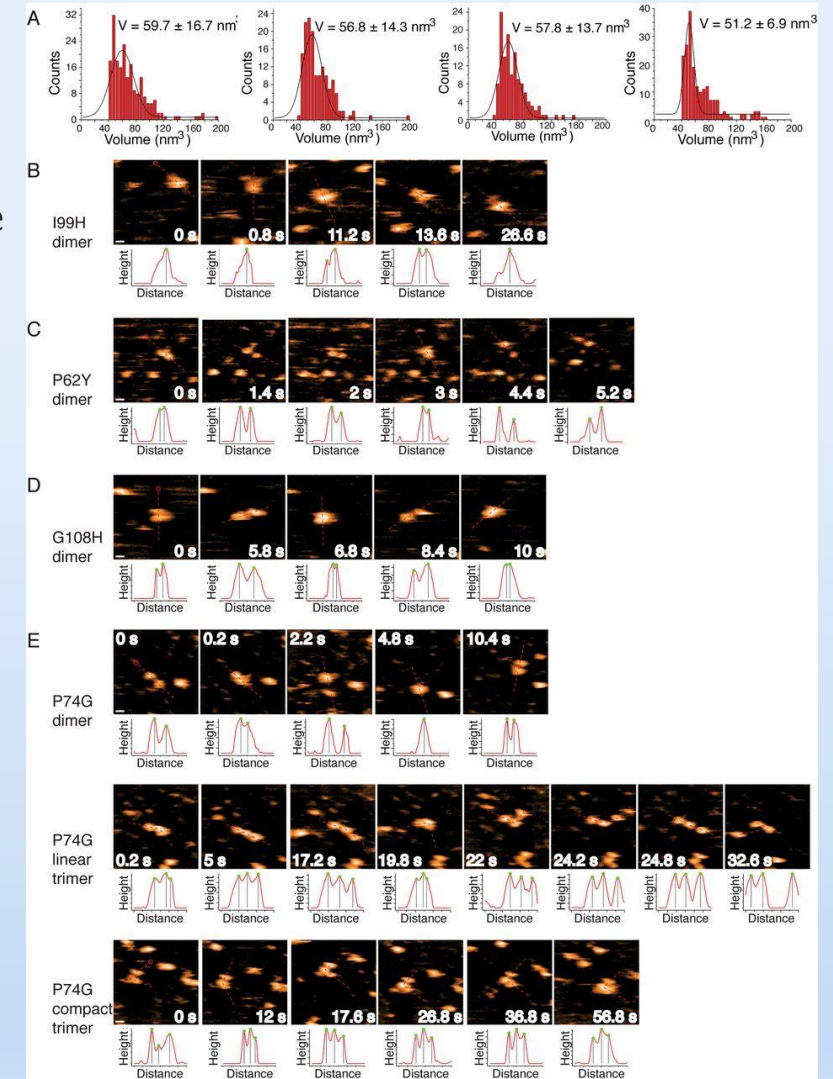
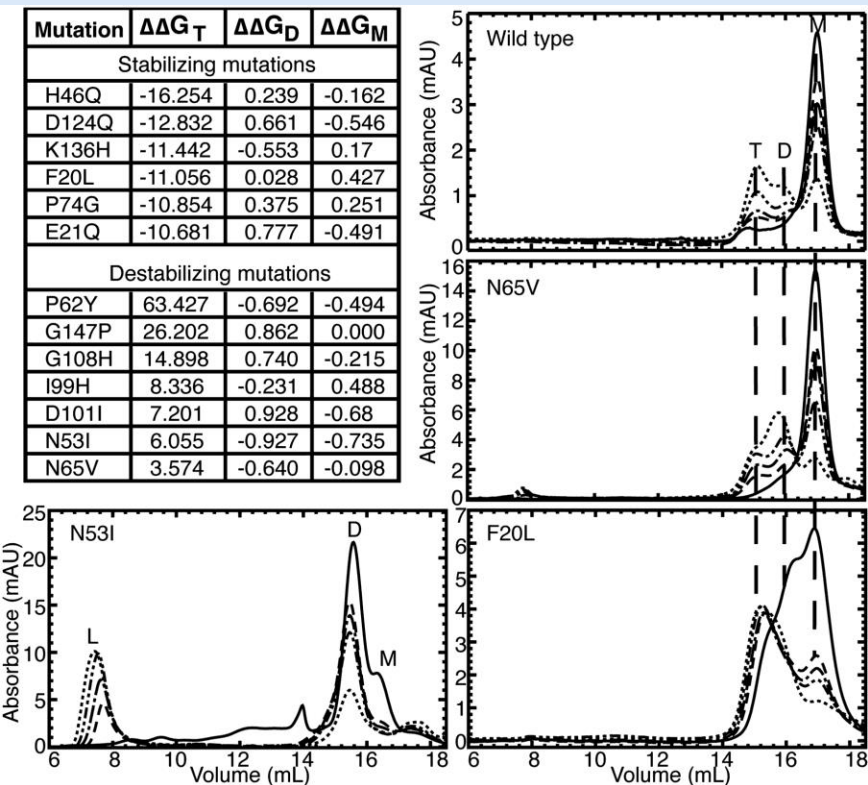


Ottenuto il modello è stato notato che:

- i singoli monomeri sono mal ripiegati con rmsds di 12,5 Å, 19,3 Å e 11,7 Å;
- l'interfaccia del trimero non è la stessa riscontrata nel dimero nativo;
- l'epitopo è completamente esposto in superficie.

Sono state progettate mutazioni che coinvolgono i singoli residui dell'interfaccia, testando come influenzano la formazione del trimero in vitro:

- dalle destabilizzanti il trimero (P62Y-SOD1, G108H-SOD1, I99H-SOD1 e N65V-SOD1, D101I-SOD1, G147P-SOD1 e N53I-SOD1) ci si aspetta una diminuzione o assenza di popolazione trimerica.
- dalle stabilizzanti il trimero (F20L-SOD1) ci si aspetta un aumento di popolazione trimerica.

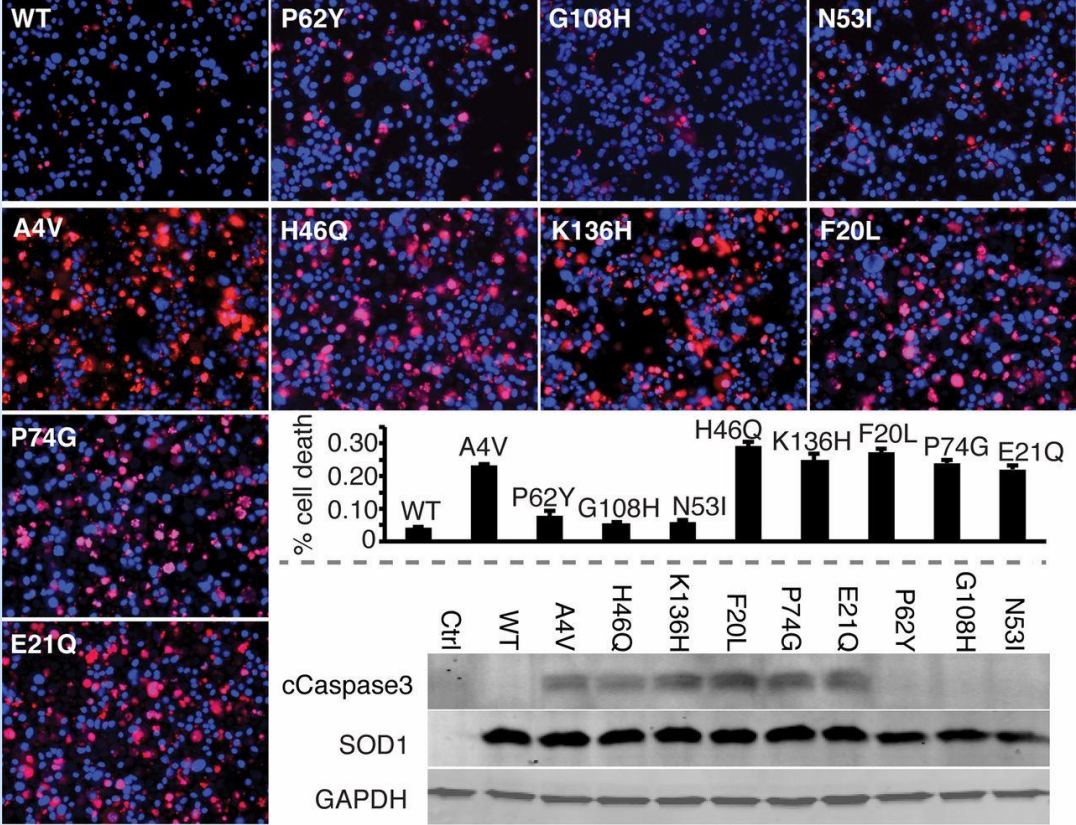


Sono state selezionate mutazioni aventi effetti significativi sulla stabilità del trimero, con variazione dell'energia libera ( $|\Delta\Delta G_{Mut}| > 3$  kcal/mol).



Per verificare se le mutazioni stabilizzanti il trimero promuovano la morte cellulare, sono state infettate cellule simili a motoneuroni: NSC-34, trasfettandovi i mutanti SOD1 progettati, cellule che esprimono la mutazione A4V (utilizzata come controllo positivo della morte cellulare) e WT SOD1 (utilizzato come controllo negativo).

Le cellule ibride NSC-34 che esprimono A4V SOD1 o mutanti SOD1 stabilizzanti i trimeri precedentemente progettati, sono soggette ad un aumento notevole della morte cellulare.



Percentuale di cellule totali che presentano colorazione PI: WT, 4%; P62Y, 8%; G108H, 5%; N53I, 6%; A4V, 23%; H46Q, 29%; K136H, 25%; F20L, 27%; P74G, 24%; E21Q, 22%.



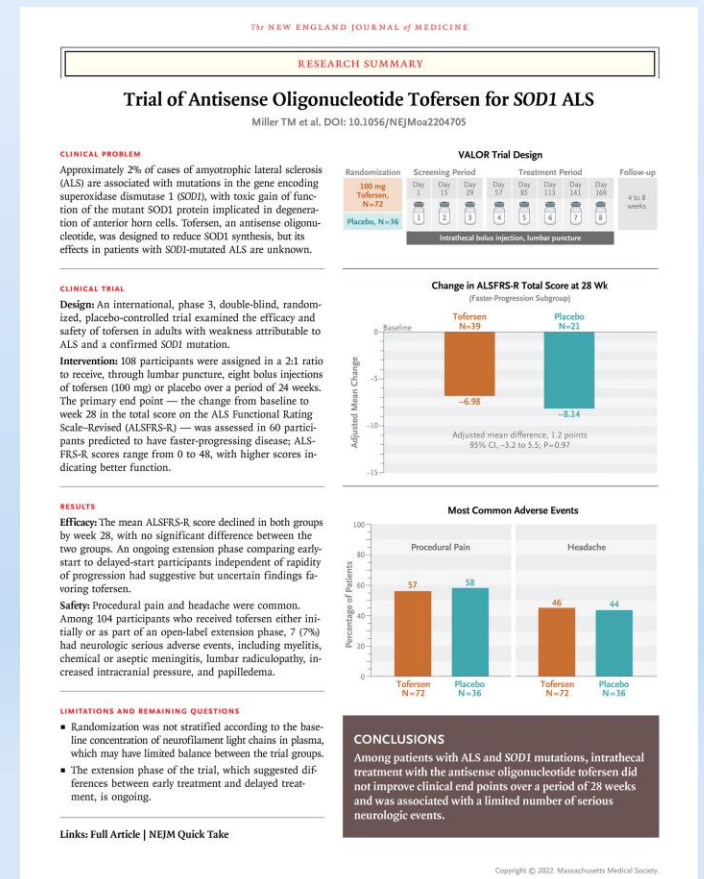
# ...CONCLUSIONE

Rispetto ad un'epoca passata in cui si presupponeva alla base della eziopatogenesi della SLA il legame tra la citotossicità e i grandi aggregati amiloidi, oggi ci sono diverse linee di evidenza che propongono invece la forma trimerica della SOD1, come possibile causa della morte cellulare dei motoneuroni.



Grazie agli studi condotti in questa direzione...

[Risposta delle catene leggere dei neurofilamenti durante la terapia con oligonucleotide antisenso tofersen nella SLA correlata a SOD1: esperienza terapeutica nella pratica clinica - Meyer - 2023 - Muscle & Nerve - Wiley Online Library](#)



## Alcuni dei metodi e materiali utilizzati

- Per la determinazione dei siti proteolitici è stato isolato e purificato SOD1 da eritrociti umani.
- Per generare mutanti è stato eseguito il clonaggio, l'espressione e la purificazione di SOD1 ricombinante umano in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Per formare il trimero SOD1 è stato incubato il dimerico SOD1 ad una concentrazione di 100-120  $\mu\text{M}$  in acetato 50 mM, NaCl 150 mM e EDTA 10 mM a pH 3,5 per 24 ore. Sono stati poi isolati trimero e monomero con l'utilizzo di un purificatore AKTA.

Proteolisi limitata, tecnica che consente di preservare l'integrità strutturale del trimero durante il periodo di reazione, è stata eseguita:

- a 25°C
- in un tampone da 100 mM acetato, fosfato o Tris appropriato per ciascun enzima;
- a pH appropriato per ciascun enzima;
- in un arco di tempo da 1 a 50 minuti, sufficiente per consentire un singolo taglio e non più di 4;

(es: reazioni di proteasi V8 in un tampone fosfato da 100mM fosfato, a pH 4,0 per 1 minuti).

## Passaggi per la misurazione della citotossicità del trimero:

- sono state mantenute linee cellulari ibride del midollo spinale di neuroblastoma (nsc-34) in dmem contenenti il 10% (vol/vol) di fbs;
- sono state placcate ~5.000 cellule nsc-34 in un pozzetto di una piastra a 24 pozzetti con mezzo di differenziazione [1% fbs, 1% integratore di aminoacidi non essenziali, (vol/vol) 10 µm di ra];
- dopo un periodo di differenziamento, sono state trasfettate cellule con 2 µg di plasmidi che codificano mutanti wt sod1 o sod1 (all'interno del vettore pci-neo) utilizzando lipofectamine 3000 (thermo fisher scientific);
- sono state fissate le celle 24 ore dopo la trasfezione utilizzando pfa al 4% (vol/vol) per 10 minuti a temperatura ambiente;
- sono state bloccate con il siero di capra al 3% (vol/vol), seguito da abs contro sod1 (sigma) e controcolorante hoechst 33342;
- è stata eseguita la colorazione con ioduro di propidio (rosso) e hoechst (blu) in coltura 3 d posttrasfezione senza fissazione;
- è stato eseguito western blot con ~20.000 cellule per pozzetto, raccogliendo cellule 2 giorni dopo la trasfezione;
- sono state lisate cellule in pbs con triton x-100 allo 0,5%, edta 0,5 mm e inibitore della proteasi privo di edta (roche life sciences);
- sono stati denaturati i lisati cellulari e risolti utilizzando sds/page al 18% (vol/vol);
- sono stati incubati con abs contro caspasi-3 scissione (cell signaling technology), sod1 (calbiochem) e gapdh (chemcon), seguita da incubazione secondaria di ab;
- sono state visualizzate le bande proteiche utilizzando un sistema di imaging ir odyssey (li-cor biosciences).

## REFERENZE:

- <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1516725113#abstract>
- [Oligomeri SOD1 nella sclerosi laterale amiotrofica - PMC \(nih.gov\)](#)
- [Frontiere | Un ruolo emergente per la SOD1 wild-type mal ripiegata nella patogenesi sporadica della SLA \(frontiersin.org\)](#)
- [La SOD1 wild-type e la SOD1 mutante condividono una conformazione aberrante e una via patogenetica comune nella SLA - PMC \(nih.gov\)](#)



**GRAZIE DELL'ATTENZIONE!**

