

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof. Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

Ocrelizumab: nuovi possibili meccanismi molecolari nella sclerosi multipla.

Relatrice:

Prof. Alessia Angela Pascale

Correlatrice:

Dott.ssa. Lucrezia Irene Maria Campagnoli

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Lucia Bacigaluppi

Anno Accademico 2023/2024

SOMMARIO

ABSTRACT

INTRODUZIONE

1.INFIAMMAZIONE	3
1.1.NEUROINFIAMMAZIONE	4
1.1.1.Chemochine e citochine	4
1.1.2.Ruolo del complemento	5
1.1.3.Ruolo della microglia	5
1.1.4.Ruolo degli astrociti	5
1.1.5.Ruolo degli oligodendrociti	6
1.2.NEUROINFIAMMAZIONE E SCLEROSI MULTIPLA	6
1.2.1.Neuroimmunologia	6
1.2.2.Struttura e ruolo della BEE in situazioni fisiologiche e patologiche	6
1.2.3.Ruolo della matrice extracellulare in condizioni fisiologiche e patologiche	9
2.STRESS OSSIDATIVO	10
2.1.DEFINIZIONE E FORMAZIONE DEI RADICALI LIBERI	10
2.2.SISTEMI DI DIFESA DELL'ORGANISMO	12
2.2.1.Antiossidanti enzimatici	12
2.2.2.Antiossidanti non enzimatici	13
2.3.EFFETTI DANNOSI DEI RADICALI LIBERI	14
2.4.DANNO DA STRESS OSSIDATIVO NELLE PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE	17
3.LA SCLEROSI MULTIPLA	17
3.1.EPIDEMIOLOGIA	17
3.2.EZIOLOGIA	19
3.2.1.Fattori genetici	19
3.2.2.Carenza di vitamina D ed esposizione alla luce solare	21
3.2.3.Infezione da virus di Epstein-Barr	23
3.2.4.Dieta	24
3.2.5.Stile di vita e fattori ambientali	25
3.3.FISIOPATOLOGIA	26
3.3.1.Demielinizzazione e danno assonale	26
3.3.2.Ruolo dell'immunità innata	28
3.3.3.Ruolo delle cellule T	29
3.3.4.Ruolo delle cellule B	30
3.4.ASPETTI CLINICI E CLASSIFICAZIONE	31
3.5.DIAGNOSI	34

3.6.TERAPIE DISPONIBILI	35
4.OCRELIZUMAB	38
4.1.MECCANISMO D'AZIONE.....	38
4.2.FARMACOCINETICA.....	38
4.3.INTERAZIONI	39
4.4.EFFICACIA.....	39
4.5.SICUREZZA	40
5.CASCATA INFIAMMATORIA PKC- β /HIF-1 α /VEGF NELLA SCLEROSI MULTIPLA	40
5.1.LA PROTEINA PKC- β	41
5.2.LA PROTEINA HIF-1 α	42
5.3.LA PROTEINA VEGF	43
6.RUOLO DI HuR NELLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA	45
6.1.LA PROTEINA HUR.....	45
6.2.LA PROTEINA HSP70	47
6.3.LA PROTEINA MnSOD	49

SCOPO DELLA TESI

MATERIALI E METODI

1.PAZIENTI COINVOLTI NELLO STUDIO CLINICO.....	53
2.ISOLAMENTO DEI PBMC DAL SANGUE PERIFERICO	53
3.WESTERN BLOTTING.....	54
3.1.PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	54
3.2.CORSA ELETTROFORETICA	55
4.ANALISI STATISTICA.....	57

RISULTATI

1.ESPRESSIONE DI PKC- β II IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON OCR	59
2.CASCATA INFIAMMATORIA ED EFFETTO DI OCRELIZUMAB	60
3.RUOLO DI HuR NELLO SVILUPPO DELLA SM	62

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

ABSTRACT

La sclerosi multipla (SM) è una patologia autoimmune caratterizzata da demielinizzazione, neuroinfiammazione e danno neuronale. L'alterata regolazione della risposta immunitaria porta diverse cellule, tra cui i linfociti T e B, i macrofagi e la microglia attivata, ad attaccare molecole *self* come la mielina, determinando una diminuzione della conduzione nervosa e neurodegenerazione. Si tratta di una patologia complessa, con un'etiologia a cui concorrono fattori ambientali e genetici e caratterizzata da sintomi diversi in base alle aree del sistema nervoso centrale che vengono colpite.

Attualmente, i trattamenti comprendono farmaci per il controllo dell'infiammazione (corticosteroidi) e le cosiddette *disease modifying therapies* che agiscono sui principali processi patogenici diminuendo il rischio di ricadute e/o rallentando la progressione della malattia. Tra queste ultime terapie, negli ultimi anni sono stati particolarmente presi in considerazione i farmaci diretti contro i linfociti B che sembrano agire anche su altri *pathways* intracellulari.

In questo contesto, il presente studio ha avuto come scopo quello di esaminare nuovi possibili meccanismi d'azione dell'anticorpo monoclonale ocrelizumab (OCR) che ha come bersaglio la proteina CD20 localizzata sulla superficie delle cellule B. In particolare, poiché la neuroinfiammazione e lo stress ossidativo sono due eventi peculiari nella patogenesi della malattia, sono state considerate due cascate proteiche: PKC- β II/ HIF-1 α / VEGF, implicata nella neuroinfiammazione, e HuR/ MnSOD e HSP70, implicata nella risposta allo stress ossidativo.

Queste due cascate proteiche sono state analizzate tramite *western blotting* effettuato su cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) provenienti da pazienti affetti da SM, in cura presso l'Istituto "C.Mondino" di Pavia, sia prima del trattamento (T0) che dopo 12 mesi di esposizione a OCR (T12), e da controlli sani.

Per quanto riguarda la cascata implicata nella neuroinfiammazione, il presente studio ha dimostrato che i valori di PKC- β II, e di conseguenza quelli del fattore di trascrizione HIF-1 α e della proteina VEGF, sono più alti nei pazienti malati al T0 rispetto ai controlli e che tornano a valori paragonabili a quelli osservati nei soggetti sani dopo 12 mesi di trattamento con OCR.

In riferimento alla cascata implicata nella protezione dallo stress ossidativo, i risultati indicano che è soppressa nei pazienti al T0 rispetto ai controlli e che dopo 12 mesi di trattamento con l'anticorpo

monoclonale i livelli delle proteine coinvolte vengono riportati a valori simili a quelli riscontrati nei soggetti sani.

In conclusione, questo studio dimostra due nuovi meccanismi d'azione di OCR: antinfiammatorio e neuroprotettivo. Tali meccanismi molecolari, in aggiunta all'effetto anti-CD20 di OCR sui linfociti B, potrebbero contribuire a contrastare la progressione della malattia.

INTRODUZIONE

1. INFIAMMAZIONE

L'infiammazione è una risposta protettiva dell'organismo a uno stimolo interno o esterno, caratterizzata dalla presenza dei cinque segni cardinali: calore, arrossamento, tumefazione, dolore e perdita di funzione.

È un processo che coinvolge le cellule dell'organismo, i vasi sanguigni, le proteine e altri mediatori con lo scopo di eliminare la causa iniziale del danno tissutale, le cellule e i tessuti danneggiati e di iniziare il processo riparativo.

Le cellule e i mediatori che prendono parte al processo infiammatorio sono di solito circolanti e lo scopo della reazione infiammatoria è quello di reclutarli verso il sito di danno per eliminarlo.

I processi infiammatori vengono classificati in acuti e cronici. L'infiammazione acuta porta rapidamente leucociti e proteine plasmatiche verso il sito di danno. Le proteine plasmatiche mediano il processo infiammatorio e fanno in modo che le cellule del sistema immunitario eliminino la causa dell'infiammazione. Successivamente, i leucociti rimuovono gli agenti che hanno scatenato l'infiammazione e iniziano il processo di eliminazione del tessuto danneggiato.

L'infiammazione cronica, invece, è un processo di lunga durata, da settimane ad anni, in cui il processo infiammatorio, il danno tissutale e la guarigione del tessuto coesistono. È caratterizzata da infiltrazione di cellule mononucleate, soprattutto macrofagi e linfociti, distruzione tissutale indotta dalle molecole prodotte dalle cellule infiammatorie e riparazione, che comprende anche la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi).

L'infiammazione è normalmente controllata e autolimitante, infatti i mediatori e le cellule del sistema immunitario vengono attivati solo in risposta a uno stimolo e hanno poi vita breve prima di essere degradati o inattivati; invece, se il processo non è ben regolato, è la risposta infiammatoria stessa a causare danno. Le componenti deputate a distruggere lo stimolo nocivo sono infatti in grado di danneggiare anche i tessuti sani, innescando una risposta infiammatoria molto forte, prolungata nel tempo o inappropriata (ossia quando è diretta verso antigeni propri dell'ospite) [1].

1.1. NEUROINFIAMMAZIONE

La neuroinfiammazione viene spesso considerata solo come un processo negativo, ma alcuni aspetti di questa sono fondamentali per lo sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC). Il processo infiammatorio, infatti, aiuta il normale sviluppo del tessuto nervoso e la sua omeostasi [2] ed è particolarmente importante, in determinati periodi di crescita, per la plasticità neuronale [3]. Le principali componenti che prendono parte al processo di neuroinfiammazione sono: i mediatori chimici dell'infiammazione, il sistema del complemento e le cellule gliali.

1.1.1. Chemochine e citochine

Chemochine e citochine sono piccole proteine coinvolte nella regolazione di cascate di trasduzione del segnale tipiche dell'infiammazione. Si tratta di molecole prodotte da macrofagi, linfociti, astrociti e microglia, con due principali funzioni: la regolazione del metabolismo neuronale e della risposta immunitaria. Solitamente queste molecole svolgono il loro compito legando recettori extracellulari e innescando diverse cascate proteiche all'interno delle cellule [4].

Le chemochine, molecole che controllano la migrazione delle cellule del sistema immunitario, prodotte a livello del SNC sono suddivise in due categorie: le molecole costitutivamente espresse e le molecole la cui produzione è indotta da processi infiammatori [5]. Le principali chemochine implicate nella neuroinfiammazione sono: MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), CXCL-9, CXCL-10 e CXCL-11, che svolgono le loro funzioni attraverso il legame con recettori associati a proteine G [6].

Le citochine prodotte a livello del SNC sono piccole molecole che regolano il processo infiammatorio e la durata della risposta del sistema immunitario. Sono suddivise tra citochine pro-infiammatorie, che si attivano prima, e citochine antinfiammatorie che, invece, regolano il processo di ritorno allo stato fisiologico. Le principali citochine implicate nella neuroinfiammazione sono l'interleuchina 6 (IL-6), l'interferone γ (IFN- γ) e l'interleuchina 1 β (IL-1 β) [5]. Un'alterata espressione di queste proteine sembra essere fortemente collegata all'insorgenza di malattie neurodegenerative e di processi di demielinizzazione [7].

1.1.2. Ruolo del complemento

Il sistema del complemento fa parte dell'immunità innata e ha il ruolo di individuare ed eliminare patogeni e materiale riconosciuto come *non-self*. In condizioni fisiologiche, le componenti del complemento non passano la barriera ematoencefalica (BEE), di conseguenza vengono in parte prodotte *in loco* dalle cellule gliali e astrociti a seguito di uno stimolo infiammatorio [8]. Così come per citochine e chemochine, la deregolazione del sistema del complemento è implicata in diverse patologie neurologiche [7].

1.1.3. Ruolo della microglia

Con il termine microglia si intendono le cellule immunitarie residenti nel SNC che sono in grado di migrare nei *foci* infiammatori [9]. Essa è implicata in molti processi fisiologici (come lo sviluppo, l'organizzazione della connettività neuronale e la regolazione della plasticità sinaptica), infiammatori e di risposta immunitaria, ma anche in diverse patologie del SNC [3].

Le cellule della microglia a seguito di uno stimolo infiammatorio si differenziano nella forma M1, o forma attiva, caratterizzata da più recettori di membrana implicati nelle vie di trasduzione del segnale tipici delle cellule dell'immunità innata, per la produzione di chemochine e citochine e per il coordinamento del processo infiammatorio [10]. Successivamente, quando la causa dell'infiammazione viene risolta, le cellule della microglia si differenziano nella forma M2, che ha un'azione antinfiammatoria: promuove la guarigione e la rigenerazione del tessuto e l'angiogenesi. La microglia ha quindi un ruolo cruciale nel limitare il processo infiammatorio [11].

1.1.4. Ruolo degli astrociti

Gli astrociti sono il tipo cellulare più abbondante nel SNC e sono le cellule di supporto dei neuroni. Si occupano non solo di mantenere l'omeostasi e la funzione neuronale, ma anche di garantire il contatto tra le cellule delle unità neurovascolari e la giusta permeabilità della BEE. Esprimono diversi recettori per citochine e chemochine e ricoprono quindi un ruolo nella risposta immunitaria [12]. In particolare, sembra che gli astrociti si occupino della fase antinfiammatoria, promuovendo il reclutamento dei linfociti T regolatori attraverso la produzione del fattore di crescita tumorale β (TGF- β) e rilasciando citochine antinfiammatorie come IL-10 [10]. Possedendo molti recettori di membrana che rispondono agli stimoli infiammatori, queste cellule, se non regolate adeguatamente, possono aumentare la risposta del sistema immunitario (sia innato, sia adattivo) e giocare un ruolo importante nell'insorgenza della neurodegenerazione [13].

1.1.5. Ruolo degli oligodendrociti

Gli oligodendrociti sono le cellule responsabili della formazione della guaina mielinica, sugli assoni dei neuroni, che consente la giusta velocità di propagazione del segnale elettrico a livello del SNC. Queste cellule erano considerate solo bersaglio della risposta immunitaria, ma, più recentemente, è stata scoperta la loro abilità di produrre un'ampia gamma di fattori immuno-regolatori, di cui possiedono i rispettivi recettori. L'interazione tra microglia, astrociti e oligodendrociti deve ancora essere chiarita, ma è evidente come il loro attacco da parte del sistema immunitario sia collegato con l'insorgenza di patologie demielinizzanti come la sclerosi multipla (SM) [13].

1.2. NEUROINFIAMMAZIONE E SCLEROSI MULTIPLA

1.2.1. Neuroimmunologia

Come già discusso precedentemente, la neuroinfiammazione è coinvolta in molte patologie del SNC e negli ultimi anni è cresciuto molto lo studio sulla connessione tra SNC e sistema immunitario. Questa branca della scienza prende il nome di neuroimmunologia [14].

La neuroinfiammazione sfocia nella patologia quando il processo di eliminazione del danno viene perpetuato nel tempo, senza dare la possibilità al tessuto di ripararsi e di tornare allo stato fisiologico. Il processo infiammatorio diventa quindi cronico e può comportare lo sviluppo di patologie neurodegenerative come la SM, la malattia di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), il morbo di Huntington e il morbo di Parkinson [5].

Il SNC è sempre stato considerato un distretto dell'organismo privilegiato per quanto riguarda il contatto con le cellule immunitarie periferiche, grazie alla presenza della BEE, invece si è scoperto che questi due sistemi sono in grado di comunicare, sia in situazioni fisiologiche che in situazioni patologiche.

I modi in cui SNC e sistema immunitario vengono a contatto sono diversi, ma la maggior parte degli scambi avviene attraverso la BEE. Il sistema immunitario è in grado esso stesso di modificare direttamente la BEE e, quindi, di influenzare il SNC, sia in situazioni fisiologiche, sia patologiche [14].

1.2.2. Struttura e ruolo della BEE in situazioni fisiologiche e patologiche

Sebbene il SNC abbia un'estesa vascolarizzazione, è isolato dalla circolazione sanguigna sistemica per mezzo della BEE, che provvede a mantenere un ambiente costante.

La BEE ha un ruolo estremamente importante nella protezione del tessuto nervoso da molecole che si trovano nel circolo sanguigno, sia endogene che esogene [15]. Inoltre, ha molteplici funzioni quali:

mantenere l'omeostasi del tessuto cerebrale e favorire la sua nutrizione, regolare i livelli dei neurotrasmettitori, limitare la quantità di macromolecole di origine plasmatica che entrano nel tessuto cerebrale e proteggere il tessuto nervoso da tossine. La BEE è costituita da diverse unità neurovascolari (NVU), ripetute nello spazio, costituite da cellule endoteliali, periciti e astrociti (Figura 1). Questa composizione è in grado di regolare finemente il passaggio di molecole grazie alla presenza di giunzioni strette e giunzioni aderenti [16]. La BEE è continua in tutto il SNC; tuttavia, la sua continuità viene interrotta in alcune porzioni dell'ipotalamo, a livello dei capillari dell'epifisi e della porzione posteriore della ghiandola pituitaria, per permettere lo scambio di ormoni con il circolo sanguigno, e a livello del plesso corioide, dove però sono presenti cellule ependimali modificate, i taniciti, che controllano l'ingresso delle sostanze nel SNC [17].

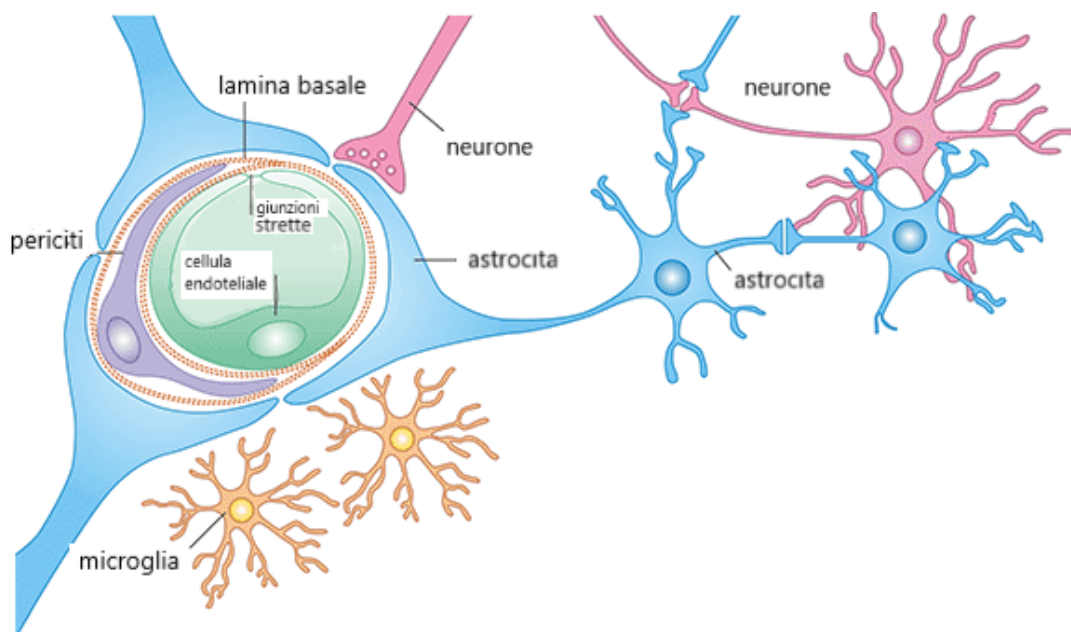


Figura 1: Struttura della BEE; sono indicate le componenti delle unità neurovascolari: periciti, cellule endoteliali e astrociti. Sono inoltre indicate le interazioni tra le unità neurovascolari, la microglia e i neuroni.

- **Cellule endoteliali:** hanno caratteristiche diverse rispetto alle cellule endoteliali di altri distretti corporei. Sono più piatte, presentano molti mitocondri e sono unite da giunzioni serrate. Il loro differenziamento comincia allo stato embrionale e viene mantenuto anche in età adulta grazie alla comunicazione con le altre cellule dell'unità neurovascolare [18]. Esse sono in grado di regolare finemente il passaggio di molecole tra circolo sanguigno e BEE in virtù della presenza di giunzioni strette e giunzioni aderenti che non permettono alle molecole di oltrepassare la barriera per via paracellulare [16]. I trasporti sono mediati da *carrier* specifici

o da recettori che mediano l'endocitosi, mentre le cellule del sistema immunitario passano solo attraverso il processo di diapedesi. L'unico passaggio che avviene velocemente e per diffusione è quello dell'ossigeno verso il SNC e della CO₂ verso il circolo sanguigno [19].

- *Periciti*: sono componenti essenziali della BEE e il loro numero varia in base alle diverse regioni del SNC. Condividono la membrana basale con le cellule endoteliali e formano con esse dei processi cellulari che hanno una struttura simile a quella delle terminazioni sinaptiche. Grazie a questi processi cellulari, periciti e cellule endoteliali sono in grado di scambiare ioni, metaboliti, secondi messaggeri e acidi nucleici. I periciti, inoltre, hanno un ruolo fondamentale nel mantenere l'integrità della BEE, regolando la neoangiogenesi e la stabilità microvascolare [20,21]. Una loro degenerazione è stata associata all'insorgenza di diverse patologie neurologiche come la malattia di Alzheimer, la demenza, la SLA e l'ictus [16].
- *Astroцитi*: svolgono diverse funzioni a livello del SNC; per esempio, compartimentalizzano il tessuto cerebrale, mantengono l'omeostasi nello spazio extracellulare, regolano il pH così come l'*uptake* e la produzione di neurotrasmettitori fornendo i substrati adeguati ai neuroni e mediano i segnali scambiati tra i neuroni e il sistema vascolare [22]. Gli astroцитi partecipano, quindi, in maniera attiva alla regolazione del SNC e prendono parte sia alla neuroinfiammazione, sia all'insorgenza di patologie neurodegenerative [23].
- *Giunzioni serrate*: queste strutture collegano le cellule endoteliali, permettendo la formazione di un epitelio serrato e il mantenimento della sua integrità strutturale e funzionale. Sono costituite da tre proteine di membrana (claudine, occludine e molecole di adesione giunzionale) e da proteine citoplasmatiche accessorie, che ancorano le giunzioni serrate all'actina del citoscheletro garantendo così la stabilità del tessuto [16].
- *Giunzioni aderenti*: ulteriori strutture che mantengono l'epitelio della BEE ben serrato. Sono costituite dalla proteina caderina, in grado di legare l'actina attraverso l'intervento di un'altra proteina, la catenina [16].

Grazie alla presenza della BEE, il movimento delle cellule immunitarie verso il SNC è finemente regolato. Durante lo sviluppo dell'embrione, le cellule mononucleate entrano nel tessuto nervoso dove si differenziano in cellule immunitarie competenti, la microglia [24].

A seguito di uno stimolo infiammatorio queste cellule possono entrare nel SNC mediante diapedesi, un processo che prevede il passaggio attraverso il citoplasma delle cellule endoteliali, e non attraverso il riarrangiamento delle giunzioni serrate come si pensava precedentemente [25]. In situazioni patologiche, invece, un'alterata produzione e secrezione di citochine, chemochine e altre molecole pro-infiammatorie, causa il danneggiamento delle giunzioni serrate delle cellule endoteliali, con conseguente rottura della BEE.

Attraverso la BEE danneggiata, i leucociti, i monociti e i macrofagi, per via paracellulare, entrano in maniera non controllata nel tessuto nervoso, dove agiscono in modo complementare alle cellule immunitarie residenti.

La perdita di funzionalità della BEE è la tappa iniziale e cruciale che porta all'insorgenza della SM. La rottura della BEE permette la migrazione incontrollata di cellule T, cellule B e cellule *natural killer* (NK) a livello del SNC, che a sua volta porta a demielinizzazione e danno assonale. Lo stato di neuroinfiammazione che insorge sostiene il reclutamento delle cellule del sistema immunitario, esacerbando il danno e interferendo con il processo di remielinizzazione [16].

1.2.3. Ruolo della matrice extracellulare in condizioni fisiologiche e patologiche

L'insorgenza e la progressione della SM è influenzata anche da modifiche della composizione della matrice extracellulare (ME). La progressione della malattia è sostanzialmente causata dalla mancata rimielinizzazione e dal conseguente danno assonale. Il fallimento del processo riparativo dipende da due fattori: il mancato spegnimento del processo neuroinfiammatorio e la creazione di un microambiente che impedisce il reclutamento e/o il differenziamento dei progenitori degli oligodendroci in oligodendrociti che producano mielina. A quest'ultimo riguardo, gioca un ruolo fondamentale la ME, che produce molecole che alterano il microambiente ed esacerbano la risposta infiammatoria [26]. In condizioni fisiologiche avviene comunque un cambiamento della composizione della ME, per aiutare il processo riparativo e i processi di risoluzione dell'infiammazione. In particolare, gli astrociti modificano la composizione delle molecole che secernono per creare una barriera, chiamata cicatrice gliale, che limita il danno e impedisce l'eccessiva migrazione delle cellule del sistema immunitario [27,28]. In condizioni patologiche, come nel decorso della SM, la modifica della ME è differente. La sua composizione si modifica a seguito

della rottura della BEE e all'accumulo di molecole plasmatiche. In particolare, il fibrinogeno di origine plasmatica, sottoforma di fibrina, si accumula insieme alla fibronectina, sopra e attorno alle cellule endoteliali, comportando un aumento dell'infiammazione, l'attivazione delle cellule del sistema immunitario e alterazione del processo di reclutamento. Nello specifico, la fibrina è in grado di contribuire all'attivazione del sistema immunitario innato, favorire l'infiltrazione delle cellule T, e modificare il differenziamento e la sopravvivenza delle cellule immunitarie in generale [29,30].

2. STRESS OSSIDATIVO

Gli organismi viventi utilizzano un'ampia gamma di reazioni anaboliche e cataboliche per sostenere le diverse funzioni biologiche. La maggior parte di queste reazioni consiste nella riduzione o nell'ossidazione di substrati (reazioni *redox*), e quindi nello scambio di elettroni tra i diversi reagenti [31]. La prevalenza delle reazioni *redox* avviene a livello mitocondriale, a valle della catena di trasporto degli elettroni, deputata alla produzione di energia nella cellula. Va ricordato che i radicali liberi che si formano nelle cellule hanno funzioni fondamentali a livello fisiologico:

- regolano il tono vascolare;
- sono in grado di regolare le vie di trasduzione del segnale a valle di diversi recettori di membrana;
- sono importanti per la risposta allo stress ossidativo.

Quando le cellule sono sottoposte a uno stimolo di stress temporaneo i radicali liberi prevengono, infatti, il danno mantenendo l'equilibrio tra nucleofili ed elettrofili [32].

2.1. DEFINIZIONE E FORMAZIONE DEI RADICALI LIBERI

I radicali liberi sono specie chimiche con un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno che le rende particolarmente reattive. I maggiori responsabili della formazione di queste molecole sono l'ossigeno e l'azoto. Quando l'ossigeno riceve un elettrone si forma lo ione superossido ($O_2 \cdot^-$) e la sua successiva interazione con altre molecole porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) secondarie, come H_2O_2 e il radicale ossidrilico ($OH \cdot$).

Analogamente a quanto succede con l'ossigeno, si formano radicali anche a partire da composti che contengono l'azoto, come per esempio il radicale ($NO \cdot$) che fa parte della famiglia delle specie reattive dell'azoto (RNS)[33]. La produzione di ROS può essere esogena o endogena. Le principali fonti esogene di radicali liberi sono le radiazioni ionizzanti, i farmaci che possiedono questo tipo di meccanismo d'azione e i sottoprodotti derivati dal metabolismo di molecole provenienti dall'esterno

come cibo e molecole inalate o assorbite attraverso la pelle; invece, la produzione endogena di radicali liberi avviene a carico di enzimi, sia mitocondriali che non, come ad esempio le monoamminossidasi (MAO) e la diidroorotato deidrogenasi [34].

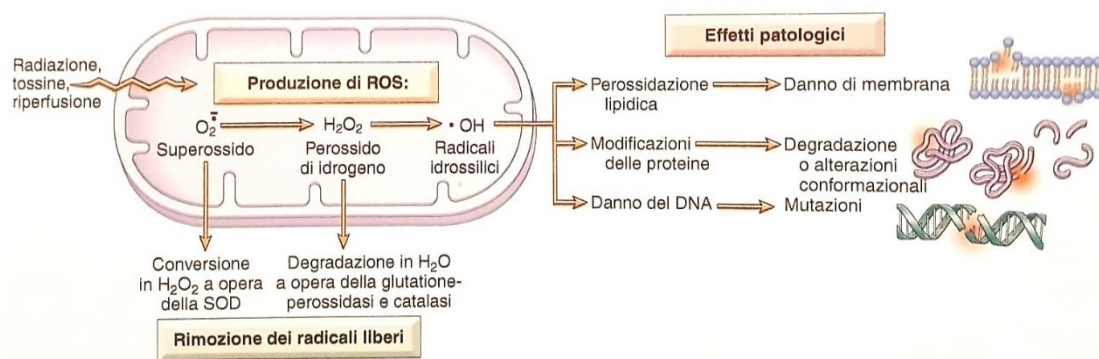


Figura 2: Schema di produzione dei ROS nei mitocondri, principali meccanismi cellulari di difesa e possibili effetti dannosi sulle cellule. ROS: specie reattive dell'ossigeno, SOD: superossido dismutasi. [1].

Va tuttavia sottolineato che la maggior parte dei radicali liberi si forma a livello dei mitocondri, e in particolare durante la respirazione cellulare e il passaggio degli elettroni nella via di trasporto usata per la produzione di energia (Figura 2).

I trasportatori di elettroni della catena respiratoria sono organizzati in quattro complessi: i complessi I e II catalizzano il trasferimento di elettroni rispettivamente da due diversi donatori, NADH e succinato, all'accettore ubiquinone. Il complesso III trasferisce gli elettroni dall'ubichinone ridotto al citocromo C. Infine, il complesso IV trasferisce gli elettroni dal citocromo C ridotto all' O_2 , completando il processo di trasporto (Figura 3).

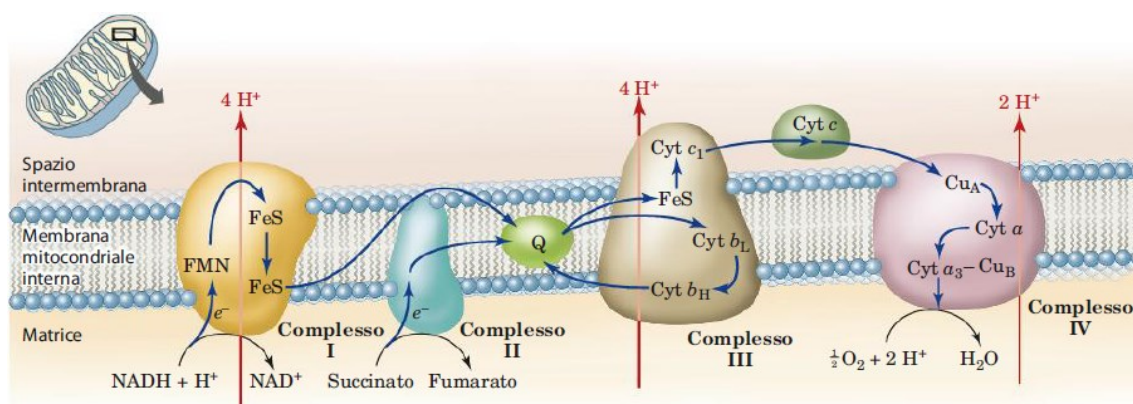
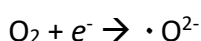


Figura 3: Via di trasporto degli elettroni comprendente complesso I (NADH deidrogenasi), complesso II (succinato deidrogenasi), coenzima Q, complesso III (citocromo C riduttasi) e complesso IV (citocromo C-ossidasi). NADH: nicotinammide adenina dinucleotide, FMN: flavina mononucleotide, Cyt: citocromo. [35].

Alcuni passaggi della via di riduzione dell'ossigeno che avviene nei mitocondri hanno la possibilità di formare radicali liberi molto reattivi, in grado di danneggiare la cellula. Per esempio, durante il trasferimento degli elettroni dal complesso I al QH₂ e dal coenzima Q ridotto (QH₂) al complesso III si forma un intermedio radicale $\cdot Q\cdot$. Questo radicale è in grado di passare un elettrone all'O₂ (pur con probabilità molto basse) e portare alla formazione dello ione superossido $\cdot O_2^{\cdot -}$ in base alla reazione:



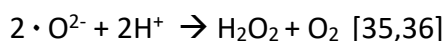
Lo ione superossido è estremamente reattivo e porta alla produzione di altri ROS come il radicale ossidrilico $\cdot OH$, oltre a H₂O₂ [35].

2.2. SISTEMI DI DIFESA DELL'ORGANISMO

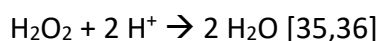
In aggiunta alla capacità di autoregolazione da parte di alcuni ROS e RNS sulla propria produzione, l'organismo possiede anche una serie di molecole in grado di ridurre le altre concentrazioni di radicali liberi, i cosiddetti antiossidanti. Si tratta di molecole, enzimatiche e non, che convertono i radicali liberi pericolosi prima a H₂O₂ e poi a H₂O e O₂ [32].

2.2.1. Antiossidanti enzimatici

- Superossido dismutasi (SOD): famiglia di metalloenzimi che necessita di ioni metallici (ferro, rame, zinco e manganese) come cofattori. Hanno un ruolo importantissimo nel neutralizzare i radicali liberi perché catalizzano la seguente reazione:



- Glutathione perossidasi (GPx): famiglia di enzimi costituita da otto diverse isoforme con una distribuzione diversa nei vari distretti corporei, ma sempre con localizzazione mitocondriale. Si occupano di detossificare l'H₂O₂ prodotta dalle SOD utilizzando come cofattore il selenio e catalizzando la seguente reazione:



- Catalasi (CAT): questi enzimi antiossidanti che coadiuvano, come la GPx, l'azione di SOD trasformando l' H_2O_2 in H_2O . Si trovano però a livello citoplasmatico e non mitocondriale [35,36].

2.2.2. Antiossidanti non enzimatici

- Vitamina E: vitamina liposolubile, in grado quindi di penetrare nelle membrane delle cellule e neutralizzare i ROS. È anche capace di interferire nel loro processo di produzione diminuendone la sintesi [37].
- Vitamina C: conosciuta anche come acido ascorbico, è una vitamina idrosolubile considerata come il *gold standard* tra le molecole antiossidanti. È infatti dotata del più elevato effetto antiossidante conosciuto. È implicata anche in altre funzioni fisiologiche come la produzione di collagene, l'assorbimento di ferro e la stimolazione del sistema immunitario [38].
- Coenzima Q: fa parte del sistema di trasporto degli elettroni nella fosforilazione ossidativa ma ha anche un ruolo antiossidante, soprattutto a livello delle membrane cellulari e nei riguardi delle lipoproteine plasmatiche. L'isoforma che si trova nell'organismo umano è il coenzima Q_{10} [39].
- Quercitina: molecola esogena riconosciuta per le sue proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. È stato dimostrato che questo flavonide è in grado di difendere in maniera particolare i neuroni dallo stress ossidativo, contrastando l'attività di diverse cascate di trasduzione del segnale implicate nel processo infiammatorio [40,41].
- N-acetilcisteina (NAC): è una molecola precursore del glutathione che presenta effetti sia antiossidanti sia antinfiammatori [42].
- Fattore di trascrizione nucleare eritroide-2 (Nrf2): è in grado di legare il DNA interagendo con specifiche sequenze, denominate ARE (*antioxidant response elements*), per aumentare la produzione di molecole contro l'elevata concentrazione di elettrofili e ossidanti [43]. Un'altra funzione importante di Nrf2 è l'inibizione del processo infiammatorio attraverso l'inibizione della cascata del fattore nucleare kB (Nf- kB), diminuendo la produzione di citochine e di radicali liberi [44].

2.3. EFFETTI DANNOSI DEI RADICALI LIBERI

Quando le cellule sono sottoposte a uno stimolo di stress duraturo e quando la quantità di radicali liberi non è controllata dagli antiossidanti, l'equilibrio *redox* viene alterato in maniera permanente e si ha come conseguenza il danno ossidativo [32]. I danni causati dallo stress ossidativo coinvolgono sostanzialmente tutte le molecole presenti nella cellula: lipidi, proteine e acidi nucleici.

Il processo di ossidazione degli acidi grassi polinsaturi prende il nome di perossidazione lipidica, una reazione suddivisa in tre fasi distinte: iniziazione, propagazione e terminazione.

1° fase → iniziazione: i lipidi maggiormente presenti nelle membrane cellulari sono i lipidi polinsaturi, i cui atomi di H in posizione α rispetto ai doppi legami sono particolarmente sensibili all'attacco dei radicali liberi, proprio per la loro posizione. Nella fase iniziale, i promotori del processo, come il radicale perossidico ($\text{OH}\cdot$), sono in grado di estrarre questi atomi di H formando un radicale libero lipidico.

2° fase → propagazione: una volta formato, il radicale libero lipidico, essendo molto reattivo, tende a reagire rapidamente con l'ossigeno presente nella cellula formando un radicale perossidico lipidico ($\text{ROO}\cdot$). Questo radicale può reagire con altri lipidi estraendo gli H in α ai doppi legami e formando altri radicali in quella che diventa una reazione a catena (Figura 4).

3° fase → terminazione: in situazioni fisiologiche il processo di ossidazione viene interrotto dalle molecole antiossidanti che, donando un atomo di H al radicale libero, lo neutralizzano. L'antiossidante diventa esso stesso un radicale libero, sebbene meno reattivo e più stabile. Il radicale dell'antiossidante può reagire con un altro radicale interrompendo la reazione a catena.

Quando non sono presenti abbastanza antiossidanti la reazione a catena prosegue fino alla formazione di prodotti secondari. I principali prodotti secondari della perossidazione lipidica sono aldeidi come malondialdeide (MDA), propionaldeide e 4-idrossinonenale (4-HNE) [45].

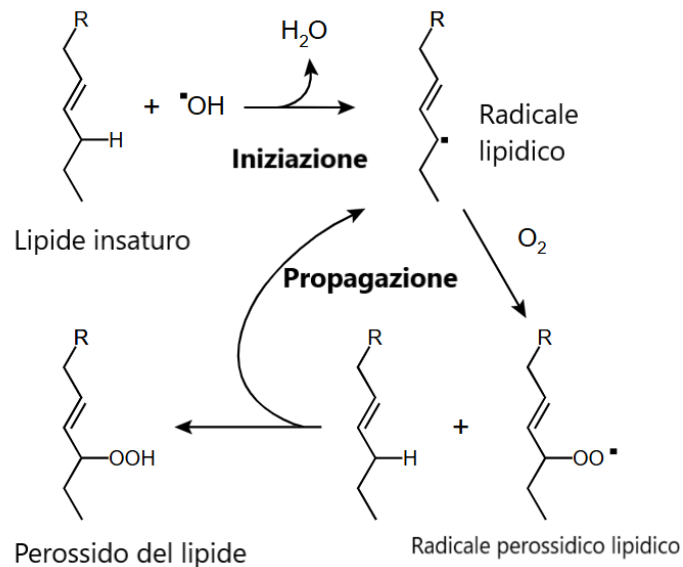


Figura 4: Schema di reazione delle prime due fasi del processo di perossidazione di un lipide generico.

L'ossidazione delle proteine avviene generalmente sui residui di triptofano, tirosina, istidina e cisteina, che sono gli amminoacidi più sensibili per via della loro struttura chimica. La modifica della struttura primaria della proteina influisce anche sulle strutture secondaria e terziaria comportandone la perdita di funzionalità.

Le due conseguenze principali dell'ossidazione proteica sono: la modifica dei *pathways* intracellulari, che risentono della perdita di funzionalità di determinate proteine, e l'accumulo di proteine che, a causa della modifica della loro struttura, non vengono riconosciute adeguatamente dai sistemi di smaltimento cellulare [32,46].

I ROS possono avere anche un'azione mutagena e cancerogena andando ad alterare, sempre per ossidazione, le basi del DNA. La maggior parte delle mutazioni indotte dai ROS sembrano coinvolgere una modifica della guanina in timina ($\text{G} \rightarrow \text{T}$). Se la mutazione avviene su un oncogene o su un gene oncosoppressore, l'azione dei ROS può indurre sia iniziazione, sia progressione del processo cancerogeno [47].

Oltre ai danni alle diverse macromolecole, i ROS possono indurre morte cellulare per attivazione della via intrinseca dell'apoptosi (Figura 5).

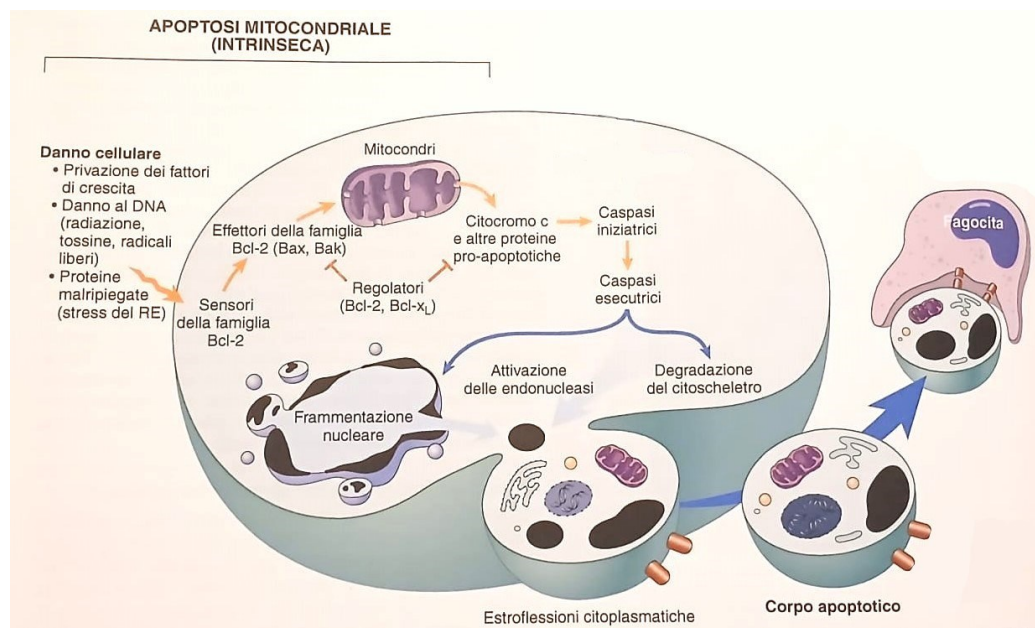


Figura 5: Schema del processo apoptotico mediato dalla via intrinseca, quella attivata a seguito di un'elevata concentrazione di ROS nella cellula. Bcl-2 e Bcl-x_L: proteine pro-apoptotiche, Bax: proteina anti-apoptotica, RE: reticolo endoplasmatico (modificata da [1]).

L'apoptosi è un tipo di morte cellulare che deriva dall'attivazione di enzimi chiamati caspasi, ricchi di cisteina che tagliano le proteine in corrispondenza dei residui di acido aspartico.

La via intrinseca viene innescata dall'attivazione delle caspasi pro-apoptotiche Bax-Bak, che dimerizzano e formano un poro sulla membrana mitocondriale esterna che permette la fuoriuscita del citocromo C e di altre proteine mitocondriali. La fuoriuscita del citocromo C induce l'attivazione della caspasi-9, che a sua volta taglia e attiva le cosiddette caspasi esecutrici, proteine che portano alla degradazione del DNA e del citoscheletro causando la morte cellulare. Il citocromo C, inoltre, inibisce le funzioni delle caspasi anti-apoptotiche, come Bcl-2 e Bcl-x_L.

Le cellule in apoptosi vengono eliminate dai fagociti grazie all'esposizione di molecole specifiche, come la fosfatidilserina. Questa si trova di solito sul lato interno della membrana plasmatica, ma a seguito dell'apoptosi viene esposta all'esterno della cellula e viene riconosciuta dai fagociti. Le cellule in apoptosi secernono inoltre fattori solubili che richiamano i fagociti [1].

2.4. DANNO DA STRESS OSSIDATIVO NELLE PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE

Il SNC è particolarmente suscettibile allo stress ossidativo per diverse ragioni: necessità di produrre molta energia, elevata attività dei mitocondri, alta concentrazione di grassi polinsaturi e presenza di diversi micronutrienti, come il ferro, che possono essere usati come cofattori dagli enzimi responsabili della produzione di radicali liberi [48].

Lo stress ossidativo è associato all'insorgenza e alla progressione di diverse patologie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington, la SM e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Nonostante queste malattie abbiano meccanismi di patogenesi diversi tra di loro, è noto come ci siano dei processi molecolari in comune, come lo stress ossidativo [34].

Per quanto riguarda la SM (si veda la descrizione più avanti) è stato dimostrato come lo stress ossidativo sia attivamente coinvolto in tutte le fasi principali della patologia come la demielinizzazione, la degenerazione assonale e l'infiammazione [49].

Nelle lesioni attive della SM sono evidenti profonde alterazioni delle proteine mitocondriali, danni al DNA e accumulo di fosfolipidi ossidati a livello degli assoni dei neuroni. Gli oligodendrociti, inoltre, mostrano alti livelli di ossidazione al DNA.

La gravità del danno ossidativo sembra essere correlata all'estensione dell'infiammazione, un altro fenomeno importante nella progressione della malattia [50,51].

Sebbene l'infiammazione e lo stress ossidativo siano due processi totalmente diversi, in relazione all'insorgenza e progressione della SM sono collegati e si influenzano a vicenda. Lo stress ossidativo modifica la risposta immunitaria; ad esempio la presenza del radicale $\text{NO}\cdot$ sembra essere correlata alle disfunzioni della BEE. D'altra parte, la microglia attivata secerne ROS per svolgere la sua azione protettiva aumentando lo stress ossidativo già esistente e perpetuando così un circolo vizioso [52,53].

3. LA SCLEROSI MULTIPLA

3.1. EPIDEMIOLOGIA

La SM è una patologia presente in tutto il mondo, con circa 2,8 milioni di persone con questa diagnosi. L'insorgenza è più alta in Europa, dove gli Stati in cui si registrano più casi sono San Marino (337 casi su 100000 abitanti), Germania (303 casi su 100000 abitanti) e Danimarca (282 casi su 100000 abitanti), e in America settentrionale, sia in Canada che negli USA (288 casi su 100000 abitanti). Le zone a più basso rischio sono invece il sud-est asiatico e l'Africa (Figura 6) [54].

Diversi studi hanno correlato l'incidenza della SM nelle diverse regioni del mondo alla latitudine: il rischio di avere la malattia aumenta all'aumentare della distanza dall'equatore. Si pensa che questo sia dovuto a una diversa esposizione alla luce solare e quindi a una diversa produzione di vitamina D da parte di ciascun individuo. A tale riguardo, si è inoltre osservato come l'emigrazione verso regioni con rischio di insorgenza diverso non modifichi la probabilità di sviluppare la malattia, mentre i figli di immigrati tendono ad avere il rischio di sviluppare la malattia proprio del luogo in cui sono nati [55].

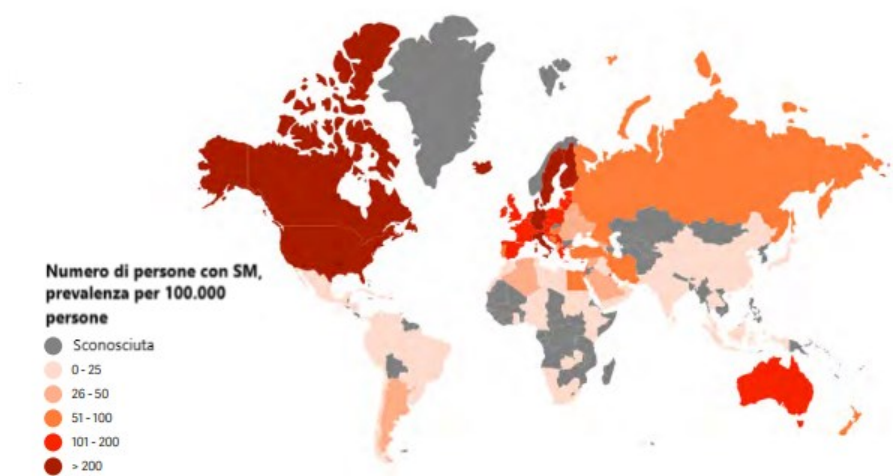


Figura 6: Rappresentazione del numero di persone affette da SM nei diversi Stati del mondo (numero/100.000 abitanti) [54].

Attualmente, la SM ha un maggiore tasso di insorgenza nelle donne, ma non è sempre stato così. Infatti, all'inizio del 1900 il rapporto tra donne e uomini era vicino a 1:1, ma con gli anni i casi di SM sono aumentati nel sesso femminile a causa del fatto che sono state man mano più esposte a determinati fattori di rischio (come fumo e alcol) [55].

La SM ha un'età media di insorgenza di 32 anni, e questo la differenzia da altre malattie neurodegenerative che invece si manifestano oltre i 65 anni. Tuttavia, anche l'età media di insorgenza varia molto in base alla regione del mondo che si sta considerando (dai 20 ai 50 anni) [54].

3.2. EZIOLOGIA

La SM è una patologia complessa e multifattoriale, la cui eziologia non è ancora del tutto chiara. Ad oggi è stato dimostrato che, pur non essendo una malattia ereditaria, esiste una base genetica che non è però condizione sufficiente per lo sviluppo della malattia. Intervengono infatti anche diversi fattori ambientali che incidono sulla predisposizione genetica già presente.

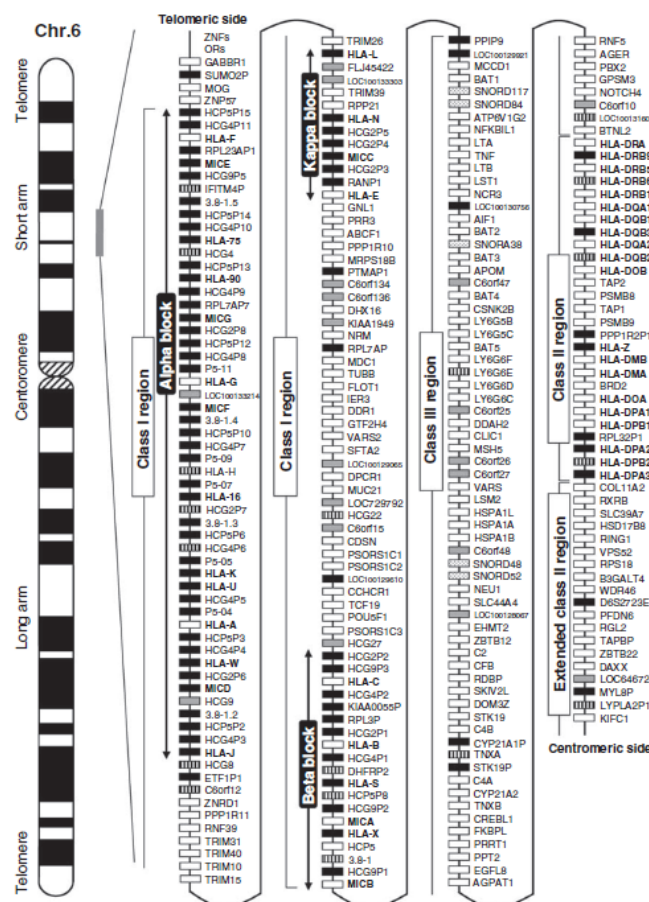
3.2.1. Fattori genetici

Per la popolazione in generale il rischio di sviluppare la SM è dello 0,2%, mentre per i fratelli di chi ha sviluppato la patologia il rischio aumenta di 10/20 volte (2-4%), fino ad arrivare al 30% per i gemelli omozigoti. Coniugi e figli adottivi dei malati, invece, mantengono il rischio della popolazione generale.

Questo fa capire come i fattori genetici siano implicati nell'insorgenza della malattia, ma che, considerando che il rischio associato ai gemelli omozigoti è pari al 30%, sicuramente sono implicati anche altri fattori (fattori ambientali e legati allo stile di vita) [56–58].

L'associazione più forte tra le mutazioni genetiche e lo sviluppo della SM risiede nella porzione di cromosoma 6p21.3, che codifica per le proteine dei complessi maggiori di istocompatibilità (MHC). Questa porzione di cromosoma contiene circa 160 geni, molto vicini tra loro, con un ruolo importante nella regolazione del sistema immunitario.

Il gruppo di geni più legati allo sviluppo della SM è quello del *locus* dell'antigene umano dei leucociti (HLA), in particolare HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPB1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1 (Figura 7) [59].



Oltre a queste mutazioni dannose, ne esistono alcune protettive, come ad esempio HLA-A*02:01, HLA-B*44:02, HLA-B*38:01 e HLA-B*55:01, che riducono il rischio di sviluppare la malattia [65].

3.2.2. Carenza di vitamina D ed esposizione alla luce solare

La vitamina D è una vitamina liposolubile la cui funzione principale è quella di regolare l'omeostasi del calcio. Interviene anche in altri processi come proliferazione, differenziamento e apoptosi cellulare e nella risposta delle cellule allo stress ossidativo.

Esiste in due forme: la vitamina D₂ o ergocalciferolo (di origine vegetale) e la vitamina D₃ o colecalciferolo (di origine animale) [66,67]. Solo una piccola parte della vitamina D necessaria all'organismo deriva dalla dieta. La maggior parte viene prodotta a livello della pelle a seguito dell'esposizione alla luce solare; la pro-vitamina D₃ (o 7-deidrocolesterolo) viene trasformata in pre-vitamina D₃ grazie all'interazione con i raggi UVB. La pre-vitamina D₃ isomerizza successivamente a vitamina D₃ (Figura 8) [68].

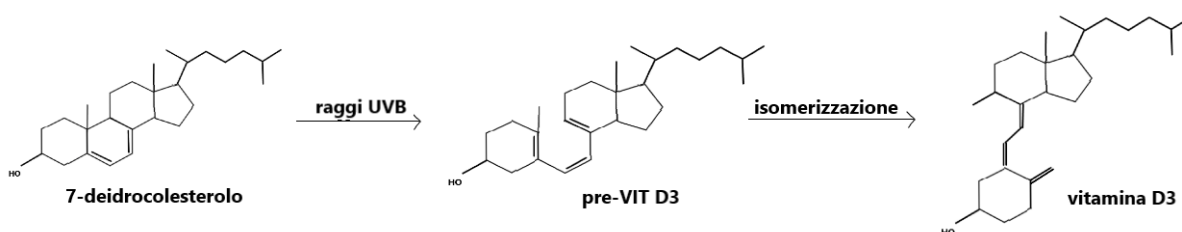


Figura 8: Sintesi della vitamina D₃ a livello della pelle

La vitamina D₃ prodotta dalla pelle o assunta attraverso la dieta o eventuali integratori, grazie al legame con proteine specifiche chiamate *vitamin D-binding proteins*, viene trasferita al fegato dove viene modificata dal citocromo CYP2R1 che aggiunge un gruppo ossidrilico, ottenendo così la 25-idrossi vitamina D₃ (o calcidiolo).

Il calcidiolo viene trasferito ai reni, dove il citocromo CYP27B1, aggiungendo un secondo gruppo ossidrilico, porta alla formazione della 1,25-diidrossi vitamina D₃ (o calcitriolo), la forma attiva della vitamina D₃ (Figura 9) [67,69].

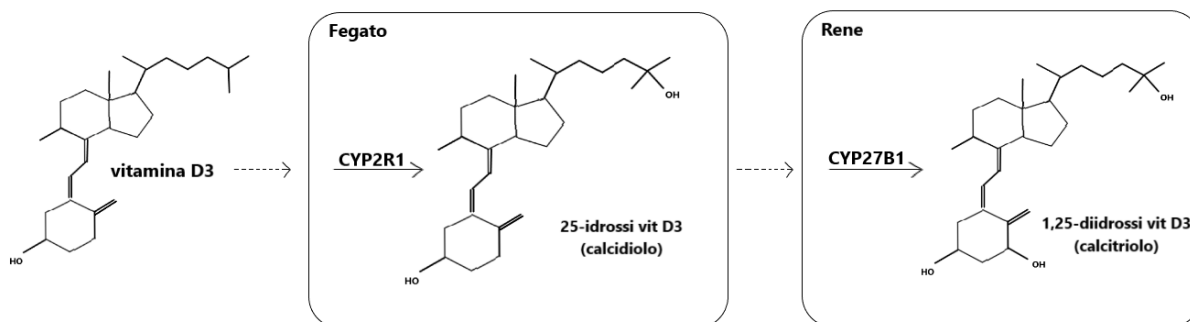


Figura 9: Trasformazione della vitamina D3 nella sua forma attiva prima nel fegato e poi nel rene. CYP: citocromo.

Come detto precedentemente, la forma attiva della vitamina D è il calcitriolo ma, a causa della sua breve emivita, per definire i livelli plasmatici di vitamina D si utilizza la concentrazione del calcidiolo. Nell'uomo si parla di carenza di vitamina D quando i valori sono compresi tra 50,5 e 72,5 nmol/L e di deficit grave per valori inferiori a 50,5 nmol/L [70,71].

La vitamina D ha un ruolo importante nella modulazione del sistema immunitario perché è in grado di modificare l'espressione di diversi geni, e la conseguente produzione di citochine da parte dei linfociti T helper Th1 e Th2.

La vitamina D, legandosi al suo recettore, presente in maniera ubiquitaria nelle cellule del sistema immunitario e nel SNC, favorisce la sua dimerizzazione con il recettore X per i retinoidi, RXR. Il complesso eterodimerico così formato migra nel nucleo dove è in grado di modificare l'espressione di geni caratterizzati da specifiche sequenze, chiamate VDRE o elementi di risposta alla vitamina D, presenti nella regione del promotore. In particolare, è in grado di indurre la trascrizione legandosi al sito promotore o di regolarla legandosi al sito enhancer del gene [72–74].

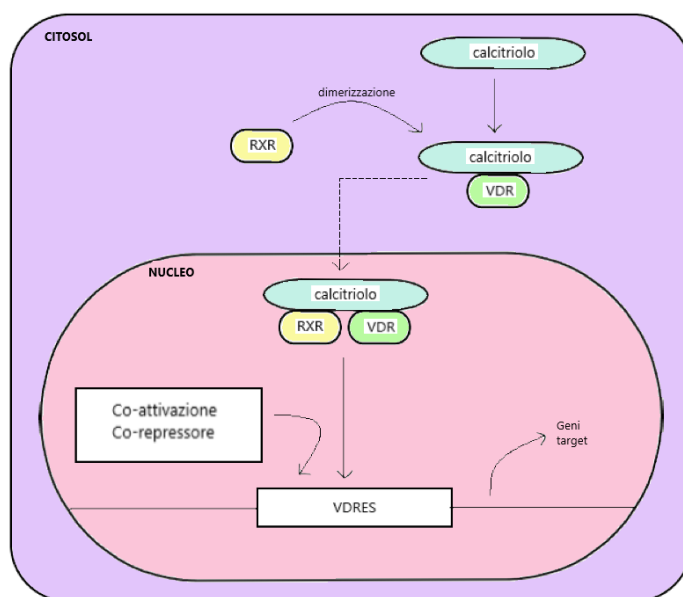


Figura 10: Schema di attivazione del recettore VDR e suo ruolo nella modifica dell'espressione genica. VDR: recettore nucleare per il calcitriolo, RXR: recettore per i retinoidi, VDRES: elementi di risposta alla vitamina D.

La carenza di vitamina D e la conseguente mancata regolazione del sistema immunitario sono stati correlati con l'insorgenza della SM. Questo è stato ulteriormente provato dal fatto che le aree geografiche in cui la SM ha un'incidenza più alta sono quelle più lontane dall'equatore, quindi dove la popolazione è meno esposta alle radiazioni UVB e produce meno vitamina D [75]. Un altro elemento che sembra confermare questa ipotesi deriva da uno studio condotto su pazienti che presentano mutazioni a livello del gene del CYP27B1. Infatti, i portatori di mutazioni a livello di questo citocromo, implicato nella produzione del calcitriolo, ha un rischio molto più elevato di sviluppare la SM rispetto al resto della popolazione [76].

3.2.3. Infezione da virus di Epstein-Barr

Il virus di Epstein-Barr (EBV), o human herpes virus 4, è un herpes virus con un DNA a doppio filamento di 173 kb e con un ciclo riproduttivo, chiamato ciclo litico, e un ciclo non riproduttivo, la cosiddetta fase latente.

Nei Paesi in via di sviluppo il primo contatto con questo virus si ha durante l'infanzia, tra i 5 e gli 8 anni, mentre nei Paesi più sviluppati il contatto viene ritardato, di solito fino all'adolescenza. Una volta contratto il virus per via aerea, il virus si replica nelle cellule dell'epitelio, fino a passare la barriera della mucosa epiteliale, e alla fine infiltra il tessuto linfoide, in particolare il cosiddetto "anello tonsillare di Waldeyer", che circonda la nasofaringe e l'orofaringe, e che comprende sia le adenoidi che le tonsille [77–79].

L'ingresso all'interno dei linfociti B mediante endocitosi avviene attraverso il legame della proteina virale gp350 con il recettore CD21 del linfocita. Oltre ai linfociti B, EBV può iniziare la sua fase latente in altre cellule del sistema immunitario come linfociti T e cellule NK, anche se il meccanismo di ingresso in queste cellule non è ancora chiaro [80].

La correlazione tra infezione da EBV e insorgenza della SM sembra essere dovuta alla presenza di una cross-reattività tra gli antigeni di EBV e alcuni antigeni *self*, che coinvolge sia l'immunità innata che quella adattativa. La cross-reattività è stata evidenziata tra alcune proteine virali, come l'antigene nucleare Epstein-Barr 1 (EBNA1), e alcune proteine *self*, come la proteina basica della mielina (MBP) e altre proteine presenti nel SNC, come la proteina alfa cristallina B (CRYAB) e la molecola di adesione cellulare gliale (GlialCAM). Grazie ad analisi di librerie di peptidi, è stato ipotizzato che questa cross-reattività sia dovuta alla somiglianza strutturale di alcuni domini di queste proteine, in particolare il maggior responsabile sembra essere il dominio 391-410 della proteina virale EBNA1. Questa somiglianza dovrebbe quindi essere la causa per cui il sistema immunitario scambia per *non-self* alcune proteine *self*, innescando la malattia autoimmune [81].

3.2.4. Dieta

Un altro fattore eziologico coinvolto nello sviluppo della SM è uno stato di infiammazione cronica, non elevato, derivante dalla dieta. In particolare, la tipica dieta occidentale, ricca di alimenti ultra-processati, sale e grassi saturi, e carente in fibre e flavonoidi, sembra essere la maggiore causa di uno stato infiammatorio cronico, che ha un notevole effetto sulla disbiosi intestinale, sulla neuroinfiammazione e sulla neurodegenerazione [82].

Sembra che un eccessivo apporto di sale con la dieta sia correlato all'attivazione del sistema immunitario e all'aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie. Il sale è uno stimolo per lo sviluppo dei linfociti Th17 e promuove l'infiammazione attraverso l'attivazione della proteina SGK1 (serum glucocorticoid kinase 1). Tuttavia, il suo ruolo nello sviluppo della SM non è ancora del tutto chiaro perché gli studi condotti fino a questo momento mostrano risultati discordanti [83,84].

La carenza di vitamina A e la carenza di acidi grassi polinsaturi (PUFA) sembra essere correlata a un maggior rischio di insorgenza della SM. Per esempio, l'acido retinoico, un derivato della vitamina A che lega e inibisce i recettori ROR γ t (*retinoid-related orphan nuclear receptor t*), ha un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità delle unità neurovascolari, nella modulazione della risposta infiammatoria degli astrociti e della microglia e nella riduzione della neuroinfiammazione [83].

Gli acidi grassi a corta catena, e ancora di più i PUFA, sono costituenti degli oligodendrociti e necessari nel processo di mielinizzazione. Inoltre, i PUFA, presenti nel pesce, nella frutta secca e nei semi, sono associati a una diminuzione dell'infiammazione e a una migliore neuromodulazione, e quindi a neuroprotezione [85].

Le due diete che hanno dimostrato effetti positivi, risultando essere quelle meno correlate con lo sviluppo di SM, sono la dieta chetogenica e la dieta MIND (*Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay*).

La dieta chetogenica, che consiste nell'assunzione di molti grassi e pochissimi carboidrati, con lo scopo di utilizzare i corpi chetonici come fonte di energia, è stata associata a minor risposta dei linfociti Th1 e Th17 (i linfociti Th1 si occupano di neutralizzare i patogeni extracellulari, mentre i linfociti Th17 si occupano di coordinare la risposta delle cellule B), a minore stress ossidativo e a una maggiore attivazione dei linfociti regolatori.

La dieta MIND, invece, consiste in un'alimentazione per la maggior parte a base di prodotti di natura vegetale con una limitata assunzione di prodotti animali e ultra processati, e sembra essere associata a proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e neuroprotettive [83].

3.2.5. *Stile di vita e fattori ambientali*

I principali fattori eziologici legati allo stile di vita sono l'obesità, la mancanza di attività fisica, il fumo, a cui si aggiungono i contaminanti ambientali a cui si può essere esposti.

Obesità: è caratterizzata da un indice di massa corporea (BMI) ≥ 30 ed è associata, oltre che allo sviluppo di SM, anche ad altre patologie, come quelle cardiache e il diabete di tipo 2. L'obesità sembra essere la causa di una neuroinfiammazione cronica di basso grado che ha un ruolo nelle modificazioni della BEE. Questo sembra attribuibile alle molecole prodotte dagli adipociti, come la leptina, la resistina e la visfatina, che promuovono la risposta infiammatoria [86].

Attività fisica: quella moderata sembra avere un ruolo positivo sia perché riduce il rischio di insorgenza di SM, sia perché migliora i sintomi della malattia. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione sottostante, si pensa che sia dovuto a un aumento del fattore neurotrofico cerebrale (BDNF), una molecola prodotta dalla microglia che, con la sua azione neuroprotettiva, promuove la sopravvivenza dei neuroni e la formazione di nuove sinapsi. Altri studi suggeriscono che l'attività sportiva riduca le citochine pro-infiammatorie (IFN- γ , IL-17 e IL-1 β), aumenti quelle

antinfiammatorie (IL-10 e TGF- α) e diminuisca lo stress ossidativo aumentando i livelli di GPx e del fattore di trascrizione Nrf2 [87].

Fumo: studi epidemiologici recenti indicano che il consumo di sigarette è correlato ad una maggiore suscettibilità a sviluppare la SM. Sembra infatti che l'effetto sia dose-dipendente e che il fumo interagisca con altri fattori eziologici per lo sviluppo della patologia. Si ritiene, inoltre, che il fumo predisponga allo sviluppo o al passaggio a forme di SM più severe dopo la diagnosi. I meccanismi attraverso i quali il fumo aumenti il rischio di SM non sono del tutto chiari, ma si pensa che siano legati all'attivazione del sistema immunitario in seguito a infiammazione e lesioni a livello dei polmoni [88].

Contaminanti ambientali: questi composti, come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), i metalli pesanti e i composti organici volatili, possono aumentare il rischio di insorgenza di SM. Essi si accumulano nell'organismo, soprattutto nelle regioni più lipofile, e creano stati infiammatori e deregolazione della risposta immunitaria [89].

3.3. FISIOPATOLOGIA

La SM è una complessa patologia cronica autoimmune del SNC, caratterizzata da demielinizzazione, infiammazione e danno neuronale. Si tratta della patologia non traumatica del SNC più comune tra i giovani adulti. L'incidenza della SM sta globalmente aumentando, così come l'impatto socioeconomico della malattia.

3.3.1. Demielinizzazione e danno assonale

La rapida propagazione degli impulsi nervosi è essenziale per il mantenimento di adeguate funzioni cognitive, motorie e sensoriali. Questo è assicurato dagli strati di mielina che rivestono gli assoni dei neuroni, che permettono il processo di conduzione saltatoria a livello dei nodi di Ranvier, domini ricchi di canali per il Na⁺ [90].

La distanza tra i nodi di Ranvier e lo spessore della guaina mielinica possono essere regolati dalla produzione di mielina da parte degli oligodendrociti. Un danno alla mielina o agli oligodendrociti, come accade nella SM, porta a un rallentamento della conduzione del segnale nervoso o a un suo blocco completo [91].

Oltre alla demielinizzazione, un'altra caratteristica importante della SM è la perdita della funzionalità e del numero degli oligodendrociti, cellule che, oltre a produrre la mielina, hanno anche un ruolo fondamentale nel sostenere il metabolismo neuronale. La perdita di mielina, pur inficiando la trasmissione del segnale nervoso, sembra non essere sufficiente per lo sviluppo del danno assonale; invece, quando vengono coinvolti anche gli oligodendrociti, il processo di demielinizzazione è accompagnato da danno assonale [92].

A seguito della perdita di mielina, i canali del Na^+ , che prima erano concentrati nei nodi di Ranvier, vengono ridistribuiti per tutta la lunghezza dell'assone e questo causa un influsso di Na^+ nella cellula e la conseguente attivazione delle pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con conseguente ingresso di calcio. Un'alta concentrazione di Ca^{2+} porta all'attivazione di proteasi che danneggiano la cellula, mentre l'alta concentrazione di Na^+ attiva le pompe Na^+/K^+ ATP-asi al fine di mantenere stabile il potenziale di membrana. Alla cellula serve quindi molto ATP per il funzionamento delle pompe e questo porta a uno stato di stress ossidativo, che la danneggia (Figura 11) [93].

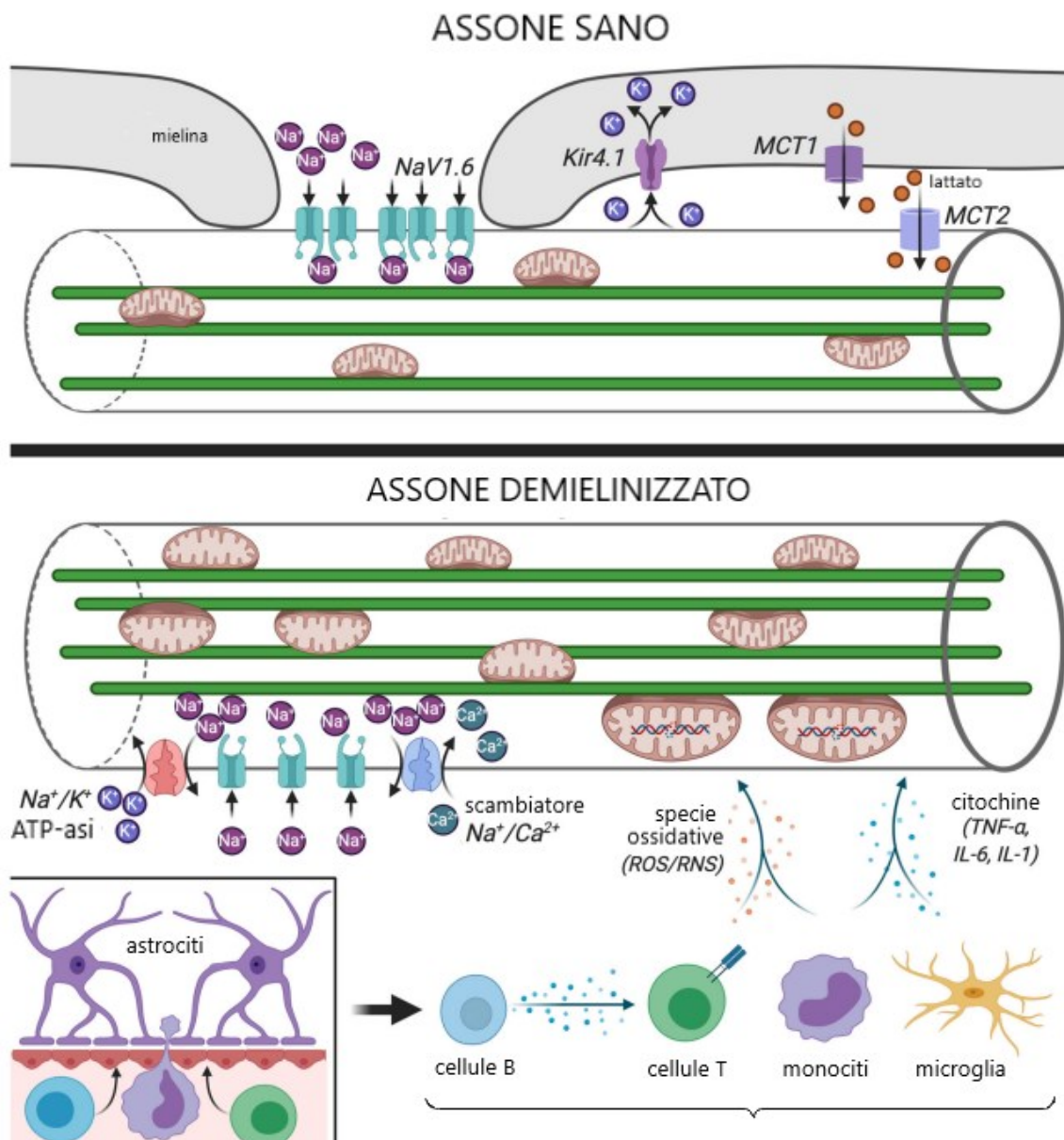


Figura 11: Confronto tra assone sano e assone demielinizzato, dove il processo di demielinizzazione è mediato dalle cellule del sistema immunitario. In particolare, sono evidenziate le cellule B, le cellule T, i monociti e la microglia attivata, che attraverso il rilascio di ROS e di citochine pro-infiammatorie portano al danno neuronale. NaV 1.6: canali del sodio, Kir4.1: canali del potassio, MCT2: canali del lattato, ROS: specie reattive dell'ossigeno, RNS: specie reattive dell'azoto [93].

3.3.2. Ruolo dell'immunità innata

Le cellule del sistema immunitario innato, implicate nel processo di patogenesi della SM e responsabili del danno al tessuto nervoso, sono la microglia e i macrofagi. Una volta attivate dai fattori solubili dell'infiammazione, queste cellule sono in grado di interagire con cellule dell'immunità acquisita, attivandola, ma anche di attaccare autonomamente la mielina e gli

oligodendrociti e di secernere ROS/RNS, essendo così responsabili di parte dello stress ossidativo che si verifica nel tessuto nervoso [94].

3.3.3. Ruolo delle cellule T

L'importante ruolo che le cellule T hanno nella patogenesi della SM è stato ampiamente dimostrato. Le cellule T del sistema immunitario acquisito, richiamate dal processo infiammatorio del tessuto nervoso grazie all'aumentata permeabilità della BEE, raggiungono il SNC dove vengono attivate dalle cellule presentanti gli antigeni (APC). Una volta attivate, sono in grado di reclutare altre cellule T e macrofagi diventando la causa della perdita di mielina e del danno assonale che portano alla formazione delle placche. Le due grandi famiglie di cellule T coinvolte sono quelle CD4⁺ e quelle CD8⁺ [95].

I linfociti CD4⁺, presenti all'interno delle lesioni e nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da SM [95], si dividono in sottofamiglie in base alle molecole che secernono e alle loro funzioni:

- Th1: secernono IFN- γ e sono di solito implicati nella neutralizzazione di patogeni extracellulari;
- Th2: secernono IL-4, IL-5 e IL-6, mediano la risposta infiammatoria autoimmune e rappresentano uno dei fattori principali di danno alla BEE e di stress ossidativo.

Queste due famiglie sono ritenute essere le cellule principali che avviano il processo patogenico;

- Th17: secernono IL-17, una molecola che attiva i linfociti B e regola la produzione di auto-anticorpi [96,97].

Esistono anche cellule T CD4⁺ con una funzione regolatoria del processo infiammatorio e neurodegenerativo. Le due famiglie più importanti sono:

- la famiglia Treg: esprime il fattore di trascrizione *Forkhead box protein 3* (FoxP3) e molecole inibitorie che bloccano la proliferazione delle cellule T CD4⁺ auto-reattive;
- la famiglia Tr1: inibisce le cellule T auto-reattive producendo IL-10 [96].

I linfociti T CD8⁺, maggiormente presenti nel SNC dei pazienti affetti da SM, soprattutto nelle zone più esterne delle placche, hanno un ruolo centrale nei processi di demielinizzazione e danno assonale [95]. Sono cellule che vengono attivate e amplificate tramite un processo antigene-dipendente [98]: esse, infatti, in seguito al riconoscimento di specifici peptidi vengono attivate

contro le cellule che producono queste stesse macromolecole. L'eliminazione avviene mediante un processo che coinvolge la secrezione di granzimi A e B e IFN- γ [99]. Probabilmente nella SM questo processo di presentazione dell'antigene attiva i linfociti T CD8⁺ contro gli oligodendrociti, le cellule che producono la mielina, e contro la mielina stessa depositata attorno agli assoni dei neuroni. Esistono anche sottofamiglie di cellule T CD8⁺ esprimenti i fattori CD22, CD28 e CD103, con un ruolo positivo nel decorso della SM. Si tratta di cellule che sopprimono la risposta immunitaria patologica e, almeno in parte, contribuiscono al rallentamento della progressione della malattia [100].

3.3.4. Ruolo delle cellule B

Se fino a pochi anni fa si pensava che nella patogenesi della SM fossero principalmente implicati i linfociti T, ultimamente questa convinzione è cambiata. È stato infatti dimostrato il ruolo fondamentale dei linfociti B che è supportato dagli effetti positivi delle terapie anti-CD20 che colpiscono proprio queste cellule.

La formazione delle cellule B inizia a livello del midollo osseo, dove i precursori maturano e si differenziano attraverso un processo antigene-indipendente. In presenza di infiammazione, queste cellule migrano nel sangue e nel tessuto infiammato, dove vengono ulteriormente differenziate mediante un processo antigene-dipendente.

Nella SM i meccanismi che permettono alle cellule B di raggiungere il SNC non sono del tutto chiari, ma è stato documentato che i danni alla BEE, insieme all'attivazione di proteine come la molecola di adesione intracellulare 1 (ICAM-1), il *very late antigen 4* (VLA-4) e la molecola di adesione delle cellule leucocitarie attivate (ALCAM) ne facilitano il passaggio. Una volta passata la BEE, i linfociti B formano delle strutture simili ai linfonodi, chiamati follicoli linfoidei ectopici, nelle meningi e in prossimità delle lesioni.

Nella SM i ruoli delle cellule B sono molteplici:

- presentano gli antigeni alle cellule T, attivandole;
- producono citochine e chemochine che portano avanti il processo infiammatorio. Per esempio, nei pazienti affetti da SM si è dimostrata un'alterata produzione di queste molecole;
- sono un *reservoir* per il virus EBV;
- si differenziano in plasmacellule che secernono auto-anticorpi diretti contro proteine dell'ospite, come la proteina basica della mielina (anticorpi anti-MBP) o la glicoproteina della mielina oligodendrocitica (anticorpi anti- MOG). Queste cellule hanno quindi un ruolo centrale nei processi di demielinizzazione e di danno assonale.

Esiste anche una famiglia di cellule B, denominate cellule B regolatorie o Breg, che sopprimono e regolano la risposta immunitaria attraverso la produzione di IL-10, IL-35, TGF β e PD-L1, che attivano le cellule Treg, e di granzimi B, che invece eliminano le cellule T patogeniche [100,101].

3.4. ASPETTI CLINICI E CLASSIFICAZIONE

I sintomi associati alla SM sono dovuti alla formazione di placche in cui si sviluppano i fenomeni di neuroinfiammazione, demielinizzazione e danno assonale. Sebbene essi varino da paziente a paziente a seconda della severità della malattia e della localizzazione delle placche, la correlazione tra lesioni e sintomi clinici non è sempre ben definita perché intervengono anche processi riparativi e di plasticità sinaptica in altre aree del SNC [102].

I sintomi più comuni sono riportati nella **Tabella 1** [103].

Tabella 1: aree implicate nella formazione delle placche e sintomi correlati

Sito di sviluppo delle placche	Sintomi
Nervo ottico	Dolore a seguito del movimento degli occhi, visione offuscata
Cervello	Diversi sintomi in base alla localizzazione delle lesioni: affaticamento, depressione, ansia, problemi cognitivi e dolore neuropatico
Cervelletto	Problemi di equilibrio
Midollo spinale	Debolezza degli arti con diminuita sensibilità e parestesie, aumento della frequenza della minzione, incontinenza e disfunzione erettile
Tronco encefalico	Visione offuscata o diplopia e sintomi simili a quelli dovuti a placche nel midollo spinale

Esistono quattro forme principali di SM, classificate in base alla comparsa dei sintomi:

- sclerosi multipla recidivante remittente (SMRR): caratterizzata da episodi acuti di peggioramento neurologico (con nuovi sintomi o con il peggioramento di sintomi già esistenti) e successivi periodi di ripresa totale o parziale, senza apparente progressione della malattia (Figura 12);

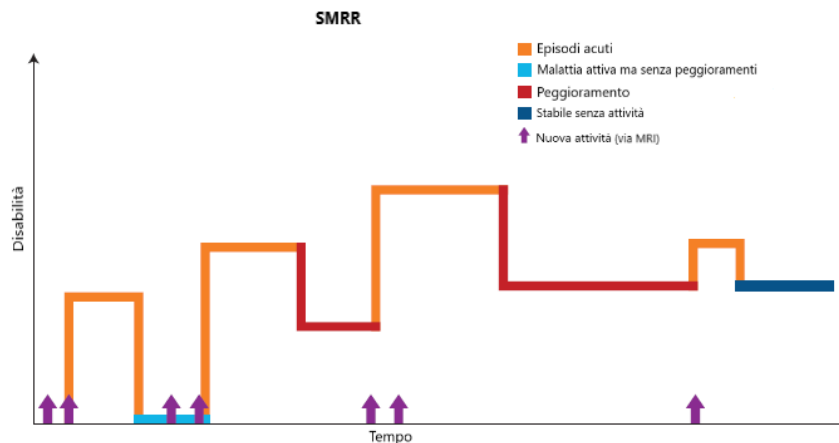


Figura 12: Schema della progressione dei sintomi della SMRR. MRI: risonanza magnetica.

- sclerosi multipla primariamente progressiva (SMPP): caratterizzata da peggioramento costante delle funzioni neurologiche fin dall'inizio della comparsa dei sintomi, senza episodi acuti nè periodi di remissione (Figura 13);

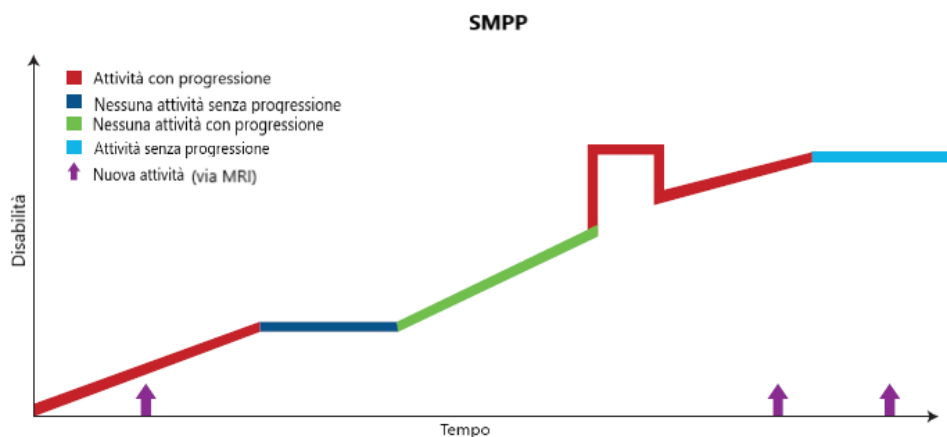


Figura 13: Schema della progressione dei sintomi della SMPP. MRI: risonanza magnetica.

- sclerosi multipla secondariamente progressiva (SMSP): dopo un andamento iniziale tipico della forma recidivante remittente, si passa a una costante progressione della malattia con o senza attacchi acuti concomitanti (Figura 14);

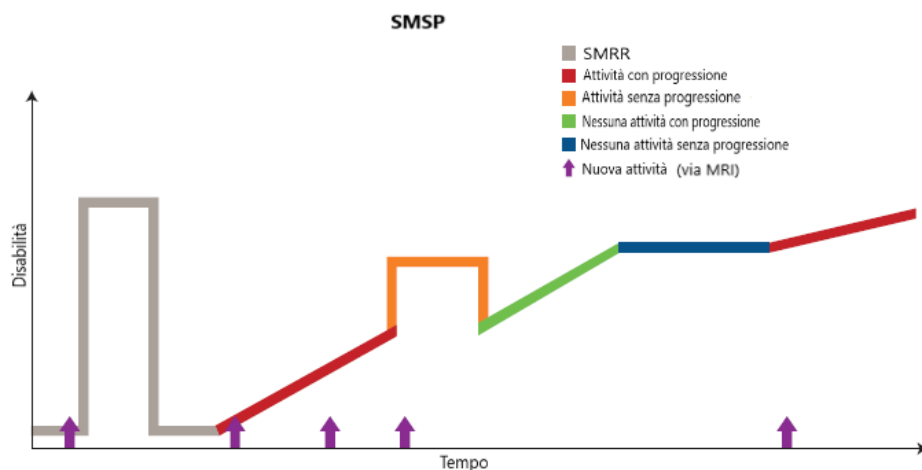


Figura 14: Schema della progressione dei sintomi della SMSP. MRI: risonanza magnetica.

- sclerosi multipla recidivante progressiva (SMRP): caratterizzata da un andamento costante della progressione della malattia, come la forma primariamente progressiva, ma con la presenza di attacchi acuti (Figura 15).

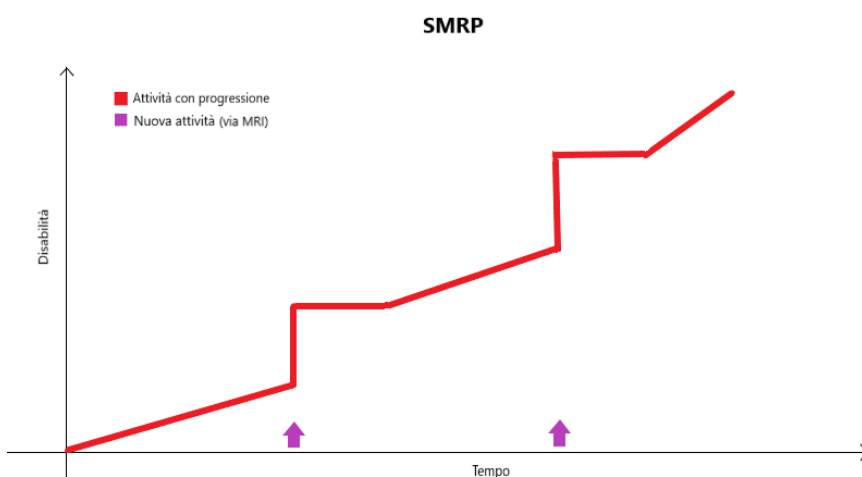


Figura 15: Schema della progressione dei sintomi della forma SMRP. MRI: risonanza magnetica.

Esistono anche due forme più rare di SM:

- sindrome clinicamente isolata (clinically isolated sindrom; CIS): caratterizzata da un episodio clinico isolato;
- sindrome radiologicamente isolata (*radiologically isolated sindrom*; RIS): caratterizzata da lesioni individuate attraverso risonanza magnetica (MRI) quando il paziente non ha sintomi clinici evidenti. Viene anche chiamata SM-asintomatica o SM-preclinica perché la maggior parte dei pazienti con questa forma sviluppa la SM sintomatica nei successivi 15 anni [104].

3.5. DIAGNOSI

Per la diagnosi di SM vengono utilizzati dei criteri diagnostici ben precisi, i più comuni sono i criteri di McDonald, introdotti nella pratica clinica nel 2001 e successivamente aggiornati in base ai risultati sui pazienti e al miglioramento delle tecniche diagnostiche, in particolare la risonanza magnetica. L'ultimo aggiornamento risale al 2017 e si basa sui concetti di disseminazione nello spazio (DIS) e di disseminazione nel tempo (DIT), evidenziati attraverso l'utilizzo di MRI.

La DIS viene dimostrata attraverso la presenza di almeno due lesioni in almeno due aree del SNC tipiche della SM (si considerano tipiche le regioni paraventricolari, perivascolari, juxtacorticali, infratentoriali e il midollo spinale). Con l'aggiornamento del 2017 non si fa più distinzione tra lesioni attive e recenti e lesioni che invece non sono più attive [105].

La DIT viene dimostrata quando, in un determinato momento, si osservano almeno una lesione attiva e una inattiva. Se non è presente una vecchia lesione, la diagnosi di SM può essere effettuata con una MRI successiva, con un'analisi positiva del fluido cerebrospinale per le bande oligoclonali, o con l'esame dei potenziali evocati.

L'MRI è una tecnica di *imaging* che permette di identificare le aree di neuroinfiammazione e demielinizzazione attraverso un agente di contrasto, il gadolinio, grazie al quale le lesioni attive appaiono come delle zone "brillanti", di piccole dimensioni e di forma irregolare. Le lesioni non più attive, caratterizzate da cicatrici gliotiche, sono invece visibili come zone più scure rispetto al resto del tessuto nervoso (Figura 16).

L'utilizzo dei criteri diagnostici ha come obiettivo quello di avere una diagnosi certa e il prima possibile, per garantire l'utilizzo di giuste terapie e al fine di migliorare il decorso della malattia e la qualità di vita del paziente. Sono inoltre molto utili per avere una diagnosi differenziale in modo da escludere altre patologie [105].

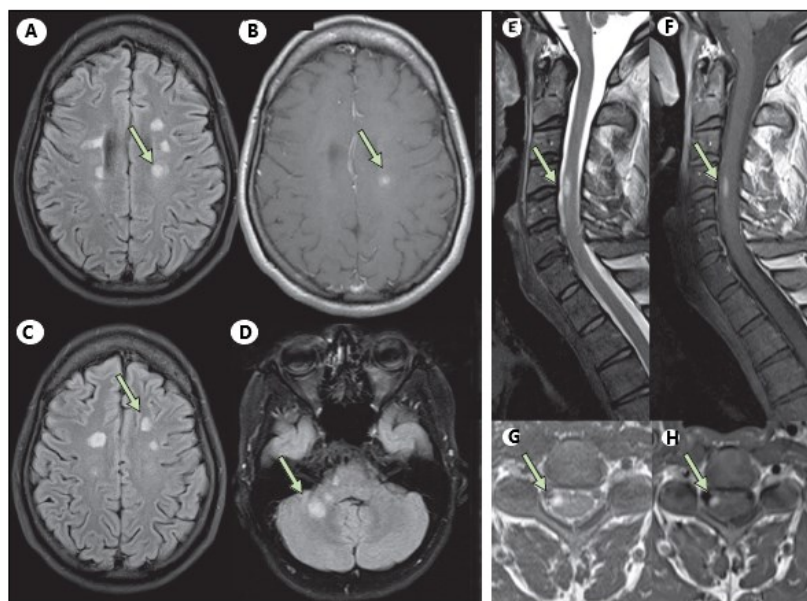


Figura 16: Lesioni attive tipiche della SM (indicate con una freccia) nel cervello e nel midollo spinale. A sinistra sono raffigurate delle scansioni MRI assiali del cervello che mostrano lesioni multiple nelle zone perivascolare (A e B), juxtacorticale (C) e intratentoriale (D); a destra sono riportate le scansioni MRI del midollo spinale sagittali (E e F) e assiali (G e H)[106].

3.6. TERAPIE DISPONIBILI

Attualmente, le strategie terapeutiche per la SM si basano sul trattamento degli attacchi acuti con farmaci sintomatici e sul cercare di rallentare il più possibile la progressione con le terapie modificanti la malattia (*disease-modifying therapies*; DMT).

Farmaci sintomatici: il trattamento delle esacerbazioni si basa sulla somministrazione di corticosteroidi, sia per via orale che per via endovenosa. In particolare, i corticosteroidi hanno azione antinfiammatoria e immunosoppressiva: essi riducono la permeabilità della BEE e diminuiscono la quantità di linfociti T CD4⁺ e la produzione di immunoglobuline. Tuttavia, sebbene questi farmaci diminuiscano la gravità dell'attacco acuto e velocizzino la ripresa del paziente, non hanno effetto sul limitare la progressione della neurodegenerazione [107].

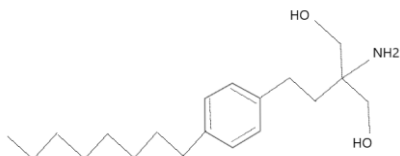
Terapie modificanti la malattia (DMT): modificano il decorso della patologia sopprimendo o regolando la risposta immunitaria. La maggior parte delle molecole ha un'azione antinfiammatoria che riduce la frequenza di insorgenza degli attacchi acuti, diminuendo così l'accumulo delle lesioni e controllando le disabilità associate.

In **Tabella 2** sono riportate le DMT disponibili per il trattamento della SM e il loro meccanismo d'azione [108].

FARMACO	MECCANISMO D'AZIONE
<i>Anticorpi monoclonali</i>	
Ocrelizumab	Anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro l'antigene CD20 espresso sulla superficie delle cellule B mature.
Rituximab	Anticorpo monoclonale chimerico diretto contro l'antigene CD20 espresso sulla superficie delle cellule B mature.
Ofatumumab	Anticorpo monoclonale umano diretto contro l'antigene CD20 espresso sulla superficie delle cellule B mature.
Natalizumab	Anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro l'integrina $\alpha 4\beta 1$, molecola di adesione dei linfociti che permette la loro migrazione nel SNC.
<i>Farmaci peptidici</i>	
Interferone- β	Riduce l'espressione di MHC sulle cellule APC, diminuisce la sintesi di citochine pro-infiammatorie e aumenta la sintesi di citochine antinfiammatorie, inibisce la proliferazione delle cellule T e ne impedisce la migrazione nel SNC
Glatiramer acetato	Controlla il bilancio tra citochine pro-infiammatorie e antinfiammatorie

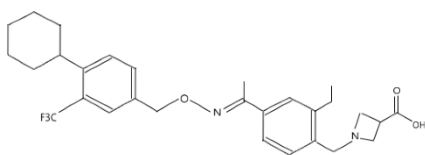
Small molecules

Fingolimod



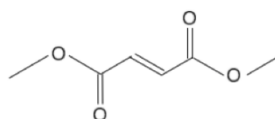
Inibisce la proteina sfingosina 1-fosfato (S1P), bloccando così l'infiltrazione dei linfociti autoreattivi nel SNC

Siponimod



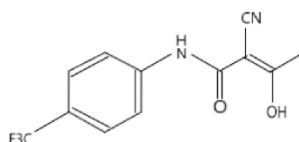
Inibisce la proteina S1P, bloccando così l'infiltrazione dei linfociti autoreattivi nel SNC. Si tratta dell'unico farmaco utilizzato per la forma secondariamente progressiva

Dimetilfumarato



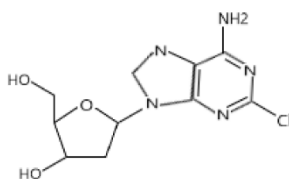
Ha un effetto antinfiammatorio e citoprotettivo per attivazione della cascata attivata dalla proteina Nrf2

Teriflunomide



Inibisce la diidrorotato deidrogenasi, l'enzima coinvolto nella sintesi delle pirimidine, e blocca la proliferazione dei linfociti

Cladribina



Analogo delle basi azotate, interferisce con la sintesi del DNA di linfociti B e T

Tabella 2: descrizione delle disease-modifying therapies disponibili per il trattamento della sclerosi multipla. APC: cellule presentanti antigene, Nrf2: fattore nucleare eritroide 2, MHC: complesso maggiore di istocompatibilità [108].

In virtù dei buoni risultati ottenuti mediante l'utilizzo delle terapie con anticorpi monoclonali anti-CD20 e in considerazione dei dati presenti in letteratura, secondo cui questi anticorpi monoclonali agiscono anche su altri *pathways* intracellulari, in questo lavoro di tesi ci si è concentrati su Ocrelizumab.

4. OCRELIZUMAB

Il successo clinico delle terapie personalizzate basate sull'uso di anticorpi monoclonali che riducono il numero di cellule B ha ampliato la concezione della SM come malattia unicamente dovuta all'attivazione dei linfociti T auto-reattivi. È quindi emerso il ruolo fondamentale dei linfociti B nella sua eziopatogenesi e, negli ultimi anni, sono stati sperimentati anticorpi monoclonali umanizzati o completamente umani diretti contro l'antigene CD20 espresso sulla superficie di queste cellule.

I ligandi naturali dell'antigene CD20 non sono al momento ben definiti, ma studi condotti con l'utilizzo di anticorpi specifici hanno dimostrato il ruolo di questo antigene nell'attivazione e nella proliferazione delle cellule B. In aggiunta, il legame con l'antigene attiva vie di trasduzione del segnale in cui sono implicate le tirosin-chinasi e la regolazione del Ca^{2+} intracellulare [109].

Un esempio di anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro l'antigene CD20 delle cellule B è ocrelizumab (OCR) (Ocrevus®), una DMT approvata in molti Stati del mondo per il trattamento della SM, in particolare per le forme SMRR e SMPP, per quest'ultima, al momento, non esistono altri trattamenti [110].

4.1. MECCANISMO D'AZIONE

Sebbene il meccanismo d'azione di OCR non sia ancora del tutto chiarito, è evidente come questo farmaco espliciti un effetto immunomodulatorio diminuendo la quantità di linfociti B, grazie al suo legame con il dominio extracellulare maggiore della proteina CD20 mediante il paratopo. Il complesso CD20 è costituito da quattro subunità, la cui aggregazione, innescata dal legame con l'anticorpo monoclonale, porta alla deplezione delle cellule B per citotossicità e fagocitosi anticorpo-mediata, ma anche per attivazione del complemento con conseguente morte cellulare [110,111].

Dal momento che l'antigene CD20 è espresso anche sulla superficie dei linfociti Th1 e Th17 che, come approfondito precedentemente, hanno un ruolo importante nella patogenesi della SM, OCR porta alla riduzione di queste famiglie cellulari [112].

4.2. FARMACOCINETICA

OCR ha parametri farmacocinetici simili a quelli che ci si può aspettare da un anticorpo monoclonale IgG. Viene somministrato per via endovenosa, quindi la biodisponibilità è del 100%. Considerata la sua via di somministrazione, per fare in modo che non venga attaccato dal sistema immunitario del paziente e che arrivi al *target* un'adeguata quantità di principio attivo, è stata effettuata una glicosilazione dell'anticorpo.

Viene metabolizzato principalmente per via catabolica, venendo trasformato in peptidi e amminoacidi. L'andamento della concentrazione del farmaco nel tempo è stato studiato con un modello farmacocinetico a due compartimenti: la *clearance* stimata è pari a 0,17 L/giorno e l'emivita stimata è di circa 26 giorni.

Non sembrano essere necessari aggiustamenti della posologia in base alla funzionalità epatica e renale e sopra i 55 anni di età [110,113].

4.3. INTERAZIONI

Non ci sono particolari interazioni tra OCR e altri farmaci, ma occorre prestare attenzione alla co-somministrazione di questo anticorpo monoclonale con altri immunosoppressori e con alcuni tipi di vaccini. L'utilizzo di altri immunosoppressori in concomitanza con OCR potrebbe portare a un effetto cumulativo pericoloso per l'insorgenza di infezioni. In Europa, l'Agenzia europea per i medicinali (EMA) sconsiglia la co-somministrazione con tutti gli altri immunosoppressori, ad eccezione dei corticosteroidi per il trattamento degli attacchi acuti.

Sebbene il trattamento con OCR porti a una minor risposta immunitaria a vaccini inattivati, anche la vaccinazione con vaccini attenuati non è consigliata. Lo stato immunologico del paziente dovrebbe essere controllato prima dell'inizio del trattamento e, eventuali vaccini, devono essere somministrati al massimo 6 settimane prima dell'inizio delle infusioni [110].

4.4. EFFICACIA

L'efficacia di OCR è stata dimostrata in comparazione con quella dell'interferone- β in 2 *trial* clinici di fase III (OPERA I e OPERA II) per la forma recidivante remittente e in uno studio chiave placebo-controllo (ORATORIO) per la forma primariamente progressiva.

OPERA I e OPERA II sono studi randomizzati, in doppio cieco, double-dummy e internazionali, in cui sono stati arruolati rispettivamente 821 e 835 pazienti con diagnosi di SMRR in base ai criteri di McDonald del 2010. In questi studi, ai pazienti è stato somministrato OCR 600 mg ogni 24 settimane o interferone- β 44 μ g 3 volte a settimana per 96 settimane. I risultati hanno mostrato come OCR riduca significativamente il tasso annuale delle ricadute (ARR) e le lesioni attive. Il miglioramento del grado di disabilità non è stato statisticamente significativo in OPERA II, ma lo è stato in OPERA I (27,7% per ocrelizumab contro il 15,6% dell'interferone- β)[114].

ORATORIO è uno studio randomizzato, in doppio cieco e internazionale, in cui sono stati arruolati 732 pazienti con diagnosi di SMPP in base ai criteri di McDonald del 2010. In questo studio ai pazienti è stato somministrato OCR 600 mg ogni 24 settimane e placebo, per almeno 5 somministrazioni. L'*end-point* dello studio era quello di valutare il tasso di peggioramento a 12 settimane, misurato mediante la scala funzionale di invalidità espansa (EDSS). Il peggioramento è stato del 32,9% nel gruppo trattato con OCR e 39,3% nel gruppo a cui è stato somministrato il placebo. Inoltre, è stato osservato un aumento delle lesioni nel gruppo placebo, rispetto alla diminuzione delle stesse nel gruppo trattato (+7,4% contro il -3,4%) [115].

4.5. SICUREZZA

OCR è un farmaco ben tollerato, come dimostrato negli studi clinici citati precedentemente e in altri contesti di somministrazione. Tuttavia, secondo le direttive dell'EMA il trattamento con OCR è controindicato in pazienti con infezioni attive o immunocompromessi.

Gli effetti collaterali più comuni sono le reazioni associate all'infusione (IRR), che includono prurito, *rash* cutanei e irritazioni alla gola. Questi sintomi sono minori se la velocità dell'infusione rimane bassa e spariscono del tutto una volta interrotta, ma se necessario è possibile somministrare antistaminici, analgesici e antiemetici. Per limitare questi sintomi è anche possibile la somministrazione di 100 mg di metilprednisolone prima dell'infusione.

Altri effetti collaterali comuni sono infezioni del tratto respiratorio superiore e del tratto urinario [110]. È importante, quindi, valutare il rischio infettivo, monitorando l'effetto immunosoppressore di OCR, tramite la misurazione della quantità di linfociti CD20⁺ rimanenti. Questi linfociti non possono essere quantificati direttamente per citometria, quindi viene utilizzato un *marker* surrogato, i linfociti B CD19⁺. La correlazione tra deplezione sierica e quella tissutale è però variabile e serve quindi anche il monitoraggio dei linfociti totali [116].

Nel corso dei *trial* OPERA I e ORATORIO sono emersi rispettivamente 2 e 4 casi di carcinoma duttale mammario, ma non sono presenti studi sufficienti a dimostrare o escludere la correlazione con la somministrazione di OCR [114,115].

5. CASCATA INFIAMMATORIA PKC- β /HIF-1 α /VEGF NELLA SCLEROSI MULTIPLA

Il ruolo del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) nella SM è stato documentato in diversi studi. In particolare, VEGF sembra avere un doppio ruolo nella patologia: all'inizio un ruolo

angiogenico/infiammatorio e in seguito un ruolo neuroprotettivo [117]. Ciò è supportato dal fatto che i livelli di espressione di VEGF sono elevati a livello delle lesioni demielinizzanti sia in fase acuta che in fase cronica [118].

La riduzione di produzione di ATP e l'aumentata richiesta di energia da parte delle cellule nervose danneggiate inducono uno stato di ipossia cronico sia a livello delle lesioni che nelle aree di sostanza grigia e di sostanza bianca circostanti. La carenza di ossigeno stimola quindi l'attivazione della cascata PKC- β /HIF-1 α /VEGF con conseguente risposta angiogenica che ha però anche un ruolo infiammatorio. L'angiogenesi ha, ovviamente, un ruolo centrale nella risposta all'ipossia del tessuto nervoso, ma permette anche a VEGF di funzionare come citochina pro-infiammatoria. La crescita di nuovi vasi favorisce il reclutamento delle cellule del sistema immunitario, quali linfociti T autoreattivi e linfociti B, ed è quindi coinvolta nella progressione della patologia.

Nelle fasi croniche e progressive della malattia, invece, l'attivazione di questa cascata sembra avere un effetto neuroprotettivo. L'aumento di espressione di VEGF, e quindi del processo di angiogenesi, avrebbe un ruolo di protezione contro lo stato di ipossia cronico del tessuto nervoso [119].

5.1. **LA PROTEINA PKC- β**

La protein-chinasi C- β (PKC- β) appartiene a una famiglia di serin/treonin chinasi scoperte nel 1977. Nello specifico, si tratta di una proteina ubiquitaria che viene attivata da Ca²⁺ e diacilglicerolo (DAG) in presenza di fosfatidilserina. Per essere attivata deve essere fosforilata su tre siti specifici: in Thr-500, localizzata nel dominio chinasicco, che a sua volta permette l'autofosforilazione in Thr-642 e Ser-661 [120].

In condizioni di riposo si trova nel citosol, mentre, quando la concentrazione di Ca²⁺ intracellulare aumenta la proteina trasloca verso la membrana dove può essere attivata attraverso l'interazione con DAG e fosfatidilserina. Una volta fosforilata e attivata, PKC- β si sposta nuovamente nel citosol dove è in grado di attivare altre proteine, tra cui il fattore inducibile dell'ipossia (HIF) [121].

PKC- β è implicata in moltissimi processi cellulari sia fisiologici, sia patologici, tra cui: la regolazione dei recettori delle cellule B, regolazione della trascrizione, proliferazione delle cellule endoteliali e l'apoptosi indotta dallo stress ossidativo [120].

In riferimento alla SM, PKC- β sembra essere coinvolta nel processo patogenico grazie al suo ruolo nell'attivazione della cascata HIF-1 α /VEGF e delle cellule T. L'attivazione delle cellule T è legata

all'attivazione del complesso molecolare CD3 che, a sua volta attivato, regola la sintesi del recettore per l'interleuchina-2 (IL-2) e dell'IL-2 stessa, necessaria ai linfociti T per il passaggio alla fase S del ciclo cellulare. L'attivazione del complesso CD3, inoltre, induce un aumento del Ca^{2+} intracellulare e di DAG, responsabili dell'attivazione di PKC- β [122].

5.2. LA PROTEINA HIF-1 α

Il fattore inducibile dell'ipossia (HIF) è stato scoperto grazie all'identificazione di una sequenza di risposta all'ipossia (sequenza HRE), localizzata nella regione dell'*enhancer* del gene dell'eritropoietina [123]. Si tratta di un complesso eterodimerico costituito dalla subunità HIF-1 α , indotta dall'ipossia e normalmente localizzata nel citoplasma, e dalla subunità HIF-1 β , che è invece costitutivamente attiva e si trova a livello del nucleo. Queste due subunità sono costituite rispettivamente da 826 e 789 amminoacidi [124].

HIF-1 α appartiene alla famiglia Per-ARNT-Sim e contiene due motivi, chiamati bHLH e PAS, che permettono il suo legame con le sequenze HRE di geni specifici, favorendone la trascrizione.

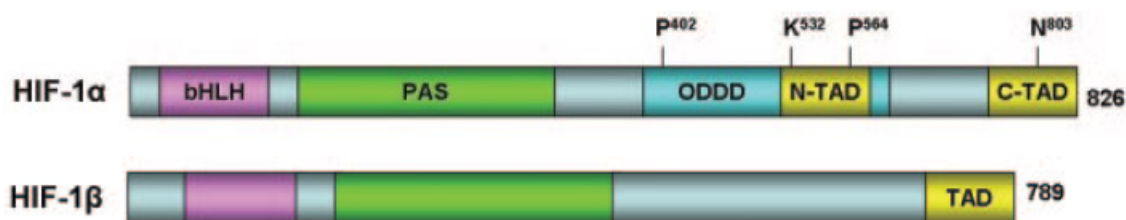


Figura 17: Schema di struttura delle due subunità della proteina HIF [125].

La subunità HIF-1 α contiene il dominio di degradazione ossigeno-dipendente (ODDD) che ne modifica la stabilità in base alla presenza o meno di ossigeno attraverso l'idrossilazione di due proline (P) e di un'asparagina (N) e l'acetilazione di una lisina (K) [126]. Presenta inoltre due regioni sulla porzione C-terminale, il dominio N-TAD e il dominio C-TAD, che permettono il legame con i co-attivatori, cioè molecole che facilitano la funzione di fattore di trascrizione. La subunità HIF-1 β invece contiene solo una sequenza TAD (Figura 17) [127].

In condizioni normali di concentrazione di ossigeno l'idrossilazione delle due proline favorisce l'ubiquitinizzazione della subunità HIF-1 α e la sua degradazione ad opera del proteasoma S26. L'acetilazione della lisina favorisce l'interazione con il complesso VHL, un insieme di macromolecole che hanno il compito di ubiquitinare le proteine da eliminare, mentre l'idrossilazione dell'asparagina impedisce il reclutamento dei co-attivatori.

In condizioni di ipossia, invece, l'idrossilazione delle proline e dell'asparagina nonché l'acetilazione della lisina sono inibite proprio dalla mancanza di ossigeno, e questo causa la stabilizzazione di HIF-1 α e la sua migrazione nel nucleo dove leggerà la subunità HIF-1 β . Verranno poi reclutati i co-attivatori e la proteina HIF potrà così svolgere la sua funzione di fattore di trascrizione.

HIF ha molteplici geni *target*: per esempio, i geni coinvolti nella sopravvivenza, proliferazione e morte cellulare, i geni implicati nel metabolismo del ferro (tra cui il gene dell'eritropoietina) e del glucosio, e quelli coinvolti nell'angiogenesi. Questi ultimi sono anche implicati nella patogenesi della SM. L'angiogenesi è un processo complesso che coinvolge i prodotti di molti geni la cui espressione è regolata da HIF, come il gene di VEGF, della monossido d'azoto sintasi, dell'eme ossigenasi-1, dell'endotelina-1 e di alcune metalloproteasi della matrice extracellulare (MMP) [125].

5.3. LA PROTEINA VEGF

Il processo di angiogenesi è un processo complesso, influenzato da molti fattori, sia pro- sia anti-angiogenici. Il più importante fattore pro-angiogenico è il fattore di crescita endoteliale vascolare [128].

Durante il periodo embrionale, il processo di formazione di nuovi vasi prende il nome di vasculogenesi e consiste nel differenziamento degli angioblasti in cellule endoteliali. Dopo la nascita, il processo di angiogenesi è fisiologico in alcuni contesti (come ciclo mestruale, gravidanza e riparazione dei tessuti danneggiati) ma allo stesso tempo può essere implicato anche in processi patologici come cancro, metastatizzazione, processi infiammatorio e ischemici, e malattie neurodegenerative come la SM [129].

La famiglia delle proteine VEGF comprende VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, PlGF (il fattore di crescita della placenta), e il fattore di crescita vascolare endoteliale derivante dalle cellule endocrine. Ogni proteina ha delle funzioni specifiche, in base alla struttura e al numero di amminoacidi da cui è formata. La proteina più caratterizzata di questa famiglia è VEGF-A, un peptide omodimerico che fa parte dei fattori di crescita denominati *cystein-knot*. Si tratta di macromolecole che possiedono al centro della loro struttura primaria un dominio ricco di residui di cisteina che permettono la formazione di ponti disolfuro e che ne determinano quindi la struttura terziaria.

La proteina VEGF-A è secreta da molti tipi cellulari tra cui cellule endoteliali, cellule muscolari, piastrine, neutrofili e macrofagi. La sua produzione aumenta in seguito a stimoli di ipossia o infiammatori. La risposta delle cellule alla secrezione di VEGF-A è mediata dal suo legame con i recettori per i fattori di crescita endoteliali vascolari (VEGFR), recettori tirosin-chinasi di classe IV. Ne

esistono di tre sottotipi, VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3, ma la proteina VEGF-A lega solo i primi due, con un'affinità maggiore per VEGFR1 ma comportando un'attività chinasi maggiore in seguito al legame con il recettore VEGFR2.

Il legame di VEGF con il recettore promuove la dimerizzazione delle due subunità con la conseguente attivazione del dominio tirosin-chinasico. Le cellule endoteliali esprimono anche un corecettore, neuropilina 1 (NRP1), che potenzia l'effetto del legame di VEGF [130].

Il gene che codifica per VEGF-A si trova sul cromosoma 6p21.1 e ha una regione codificante di circa 14 kpb, con 8 esoni e 7 introni. Lo *splicing* alternativo del pre-mRNA rimuove gli introni e forma specifiche combinazioni degli esoni per dare origine a diverse isoforme. Queste vengono indicate con la sigla VEGF_{xxx}, dove xxx sta per il numero di residui amminoacidi da cui l'isoforma è composta (Figura 18).

Quella più caratterizzata e con maggiore effetto pro-angiogenico è VEGF_{165a}. Tale isoforma sembra essere anche quella maggiormente implicata nel processo patogenico della SM. Esiste però anche una forma, denominata VEGF_{165b}, scoperta recentemente che ha invece un effetto anti-angiogenico e che quindi, ha il compito di bilanciare o inibire l'effetto delle proteine pro-angiogeniche [131,132].

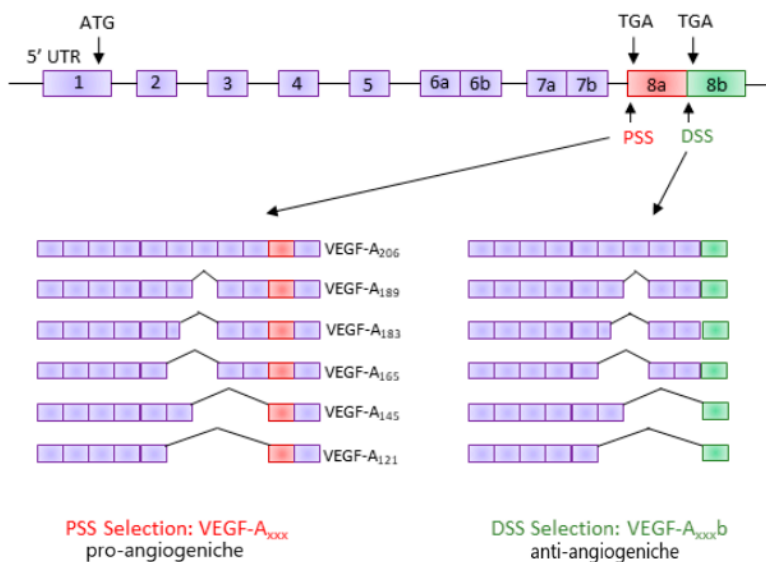


Figura 18: Isoforme del fattore di crescita vascolare endoteliale-A (VEGF-A). Il pre-mRNA è costituito da 8 esoni, la cui inclusione/esclusione dà vita a diverse isoforme con un diverso numero di amminoacidi. Nell'esone terminale (l'ottavo esone) lo splicing in un sito in 3' porta alla formazione di una nuova famiglia di isoforme: la famiglia VEGF-A_{xxx}b, che ha una funzione anti-angiogenica. PSS: sito di splicing prossimale, DSS: sito di splicing distale, UTR: regione non tradotta.

6. RUOLO DI HuR NELLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI MULTIPLA

Come già discusso precedentemente, in condizioni fisiologiche i ROS sono importanti nell'organismo perché implicati in diverse vie di trasduzione del segnale. Tuttavia, quando la concentrazione di ROS diventa troppo elevata, questi possono contribuire all'insorgenza di diverse patologie come cancro, ipertensione, diabete, aterosclerosi, infiammazione e malattie neurodegenerative come la SM [133].

Nel contesto della patogenesi della SM, negli ultimi anni si sta cercando di fare chiarezza sul ruolo della regolazione post-trascrizionale via RNA *binding proteins* (RBP), con particolare interesse verso la proteina HuR (*human antigen R*). Esistono dei lavori che descrivono il ruolo di HuR in modelli animali di SM [134,135], dove i livelli di HuR nel SNC si alzano in concomitanza con l'insorgenza della malattia. Nell'uomo, i dati disponibili si riferiscono solo a cellule periferiche e indicano che, al contrario di quanto accade a livello centrale, nei pazienti affetti da SM si assiste ad una riduzione significativa della quantità di HuR in confronto ai controlli sani. Inoltre, si osserva una correlazione tra la diminuzione della quantità di HuR e la severità della patologia. Questo apre nuove strade per comprendere il ruolo di HuR nella patogenesi della SM [136].

Nel laboratorio in cui è stato svolto questo progetto di tesi, è stato anche dimostrato il legame tra HuR e le proteine MnSOD e HSP70 e la loro implicazione nella patogenesi della SM. In particolare, è stato documentato, attraverso uno studio focalizzato su un farmaco orale per la SM (dimetilfumarato), che HuR ha come *target* l'mRNA della proteina MnSOD, e quindi gioca un ruolo importante nella protezione del tessuto nervoso dallo stress ossidativo.

Anche il ruolo della proteina HSP70 è stato indagato: sembra che una minore quantità di HSP70 possa influenzare la risposta cellulare e ridurre la capacità di contrastare lo stress ossidativo, contribuendo così allo sviluppo della SM. Alti livelli di questa proteina giocherebbero, invece, un ruolo protettivo nei confronti del tessuto nervoso [137].

6.1. LA PROTEINA HUR

Le cellule eucariotiche sono caratterizzate da una serie di meccanismi che permettono la regolazione dell'espressione genica in risposta agli stimoli dell'ambiente esterno, sia a breve sia a lungo termine. La principale regolazione è quella post-trascrizionale che può avvenire a diversi livelli: durante la maturazione del pre-mRNA, attraverso lo *splicing* alternativo, il trasporto, l'editing, la modulazione della stabilità e/o della traduzione dell'mRNA. Gli ultimi due sono i più importanti perché consentono alla cellula di regolare rapidamente la quantità di proteine sintetizzate [138,139].

Le proteine che svolgono un ruolo chiave in questo contesto sono le proteine leganti l'RNA (RBP, *RNA-binding proteins*), che sono in grado di intervenire in ciascuna fase del percorso del trascritto, dalla sua sintesi fino alla traduzione in proteina [138].

Nei mammiferi, una delle più importanti RBP è HuR, anche chiamata HuA o ELAVL1 (*embryonic lethal abnormal vision-like 1*), che appartiene alla famiglia Hu/ELAV costituita da quattro membri:

- **HuR**: principalmente localizzata nel nucleo e espressa in modo ubiquitario in moltissime cellule tra cui quelle del tessuto adiposo, dell'intestino, della milza, del cervello, del fegato e dei muscoli;
- **HuB, HuC e HuD**: espresse essenzialmente nel citoplasma dei neuroni e fondamentali per lo sviluppo neuronale, la plasticità neuronale e la memoria [140].

Il gene ELAVL1 che codifica per HuR si trova sul braccio corto del cromosoma 19 (19p13.2); è costituito da 47 kbp e conta 6 esoni e 5 introni.

La proteina HuR, costituita da 326 amminoacidi e con un peso molecolare di 36 kDa, contiene tre domini di riconoscimento dell'RNA, chiamati RRM. I primi due (RRM1 e RRM2) si trovano nella porzione N-terminale della proteina e formano una tasca alla quale si legano le sequenze degli mRNA bersaglio ricche di AU (adenina/uracile), mentre il terzo dominio, RRM3, si trova nella porzione C-terminale e contribuisce all'interazione con la coda di poli-A dell'mRNA *target* e alla stabilità del complesso trascritto/proteina. Tra i domini RRM2 e RRM3 è presente una regione variabile, denominata "cerniera", ricca di amminoacidi basici che contiene il dominio HNS (*HuR nuclear shuttling*) che permette alla proteina di entrare e uscire dal nucleo della cellula (Figura 19).



Figura 19: Struttura schematica dei domini della proteina HuR. RRM: domini di riconoscimento dell'mRNA delle proteine target [141].

Quando la proteina non lega nessun trascritto, i domini RRM1 e RRM2 assumono una conformazione "aperta", quando invece si forma il complesso proteina-mRNA la struttura dei domini si ripiega e assume una conformazione "chiusa" attorno all'mRNA bersaglio [141].

Il legame con l'mRNA avviene grazie al riconoscimento di porzioni ricche di adenina e uracile, denominate sequenze ARE (*adenine-uracil-rich elements*), e localizzate per la maggior parte nella

regione 3' non tradotta (3'-UTR) del trascritto. Circa l'8% dei geni umani contiene sequenze ARE e, teoricamente, potrebbe essere regolato da RBP come HuR.

HuR si trova nel nucleo dove, grazie al riconoscimento delle sequenze ARE, lega il trascritto bersaglio. Il complesso mRNA-proteina viene trasportato nel citoplasma grazie a una serie di fattori, come APRIL (*a proliferation-inducing ligand*), XPO1 (*exportin 1*) e trasportine 1 e 2 che interagiscono con la regione cerniera, e una volta nel citoplasma HuR protegge il trascritto dall'azione delle nucleasi (aumentandone così l'emivita) e/o ne favorisce la traduzione. Successivamente, dopo aver svolto la sua funzione, HuR torna nel nucleo [142].

Tra i *target* di HuR, come spiegato precedentemente, sono presenti gli mRNA di HSP70, MnSOD, e di proteine implicate nel processo infiammatorio. I risultati ottenuti nel laboratorio in cui ho svolto il tirocinio di tesi sono stati importanti per comprendere il legame tra la proteina HuR e le proteine implicate nella protezione dei tessuti dallo stress ossidativo, uno dei fattori importanti nella patogenesi della SM. Lo stress ossidativo, derivante sia dallo stato infiammatorio che dall'ipossia presente a livello del tessuto nervoso a seguito della modifica della BEE, partecipa infatti in modo attivo al danno assonale conseguente alla demielinizzazione [142,143].

6.2. LA PROTEINA HSP70

Le proteine da shock termico (*heat shock proteins*; HSP) sono una famiglia di proteine molto conservate in tutti gli organismi, da quelli procarioti a quelli eucarioti più sviluppati.

Si tratta di proteine ubiquitarie con funzioni diverse in base all'isoforma e alla localizzazione cellulare. Le HSP maggiormente prodotte nelle cellule sono quelle con peso molecolare 60, 70, 90 e 110 kDa. Sono proteine espresse costitutivamente nelle cellule, ma la loro espressione può essere aumentata in seguito a stress termico o stress ossidativo del tessuto [144]. I geni che codificano per la proteina HSP70 si trovano nella regione HLA, localizzata sul braccio corto del cromosoma 6. I tre geni sono: HSPA1A, HSPA1B e HSPA1L che codificano rispettivamente per le isoforme HSP70-1, HSP70-2 e HSP70-HOM. I geni che codificano per le prime due isoforme hanno un'elevata omologia, infatti le due proteine differiscono per un solo amminoacido. Tuttavia, è diversa la loro regolazione: HSP70-1 è prodotta costitutivamente e sovraespressa in caso di risposta a danno, mentre HSP70-2 è espressa solo in risposta a stimoli esterni. HSP70-HOM, invece, viene espressa costitutivamente sia in presenza sia in assenza di uno stimolo esterno [145].

HSP70, come tutte le proteine della famiglia, svolge la funzione di chaperonina. Si occupa quindi di cooperare nel mantenimento del *folding* delle proteine, nel processo di *refolding* delle proteine

alterate, nel trasporto delle proteine attraverso le membrane, nella prevenzione dell'accumulo di proteine anomale e nella degradazione delle proteine che hanno perso del tutto la loro struttura corretta [146,147].

Le regioni che permettono alla proteina di funzionare come chaperonina sono:

- dominio di legame all'ATP/ADP (*nucleotide binding domain*; NBD) posto sulla porzione N-terminale;
- dominio C-terminale SBD β : costituito da 18kDa organizzato in una struttura a β foglietto che forma una tasca di legame per la proteina substrato;
- dominio C-terminale SBD α : costituito da 10 kDa organizzato in una struttura ad α elica che agisce da "coperchio" nella tasca di legame [148].

Quando la proteina *target* non è legata, l'attività ATP-asica di HSP70 è bassa e il "coperchio" del sito di legame è aperto; invece, in seguito al riconoscimento della proteina bersaglio, l'ATP viene idrolizzato ad ADP e il "coperchio" si chiude. Una volta che la proteina *target* viene ripiegata correttamente, interviene un fattore che permette la fosforilazione dell'ADP in ATP per permettere la riapertura del "coperchio" e il rilascio della proteina (Figura 20) [149].

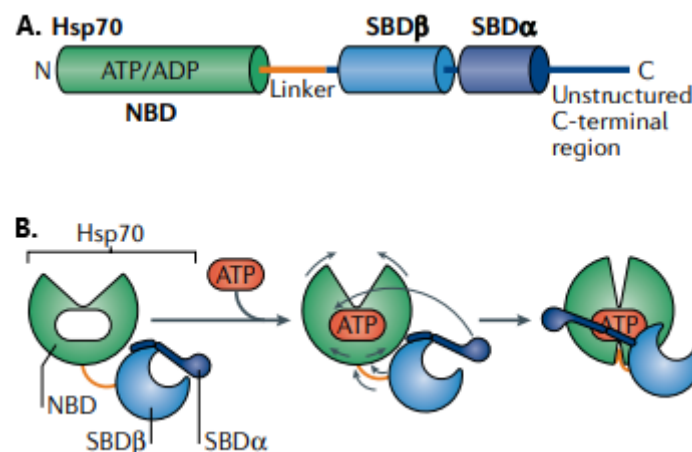


Figura 20: A) schema dei domini della proteina HSP70, B) rappresentazione schematica del cambiamento della conformazione di HSP70 a seguito del legame con ATP. Il legame dell'ATP con la subunità NBD fa sì che il coperchio si apra per permettere il legame con il substrato [150].

I processi infiammatori alla base dello sviluppo della SM dovrebbero indurre una maggiore espressione di proteine protettive, come HSP70, con l'obiettivo di proteggere il tessuto nervoso dallo stress ossidativo. In alcuni studi è stato infatti dimostrato come la stimolazione di cellule gliali umane con fattori infiammatori provochi un'aumentata produzione di HSP70 [151]. Al contrario, una

deregolazione nell'induzione di HSP70 o una sua insufficiente produzione sono correlate con la progressione della patologia e della neurodegenerazione [152].

L'implicazione di HSP70 nella patogenesi della SM è stata dimostrata anche attraverso lo studio dei polimorfismi del gene HSPA1B, in particolare il polimorfismo +1267A/G. A tale riguardo, è emerso come nei pazienti con SM la frequenza dell'allele G sia più elevata e gli individui omozigoti GG abbiano un maggior rischio di sviluppare la malattia [153]. Un altro studio ha invece valutato il ruolo di HSP70 in un modello animale di SM (encefalomielite autoimmune sperimentale; EAE). Nello specifico, si è osservato che un aumento dei livelli della proteina comporta una riduzione dell'insorgenza della patologia e a una diminuzione della sua gravità [154].

6.3. LA PROTEINA MnSOD

Le superossido dismutasi (SOD) sono una famiglia di enzimi che catalizzano la reazione di neutralizzazione dello ione superossido. Vi sono tre isoforme distinte dal punto di vista biochimico e molecolare:

- SOD-1 (CuZn-SOD): è stato il primo enzima della famiglia ad essere caratterizzato. Si tratta di una proteina omodimerica che usa come cofattori Cu e Zn e che si trova solo a livello del citoplasma;
- SOD-2 (Mn-SOD): verrà descritto in maniera più approfondita in seguito;
- SOD-3 (EC-SOD): è stato l'ultimo enzima ad essere caratterizzato. Si tratta di una proteina tetramerică che utilizza come cofattori Cu e Zn e che possiede porzione peptidica che gli permette di raggiungere lo spazio extracellulare, dove agisce.

Il gene che codifica per MnSOD si trova sul cromosoma 6q25 e contiene 5 esoni e 4 introni. Il promotore del gene non contiene nessun dominio TATA o CAAT (domini che favoriscono l'attacco della RNA-polimerasi e quindi la trascrizione del gene), ma contiene dei domini per fattori di trascrizione come NF- κ B. L'espressione della proteina, inoltre, è regolata anche a livello post-trascrizionale dal legame del suo mRNA con proteine RBP, come HuR [133].

La proteina MnSOD è un omotetramero e ognuna delle quattro subunità contiene un sito attivo con un atomo di Mn come cofattore (Figura 21). La proteina forma dei legami di coordinazione con il metallo grazie ai residui His26, His74, His 163 e Asp159 e a un atomo di ossigeno. Questi amminoacidi, che legano direttamente lo ione manganese, vengono chiamati anche "anello

interno”, mentre quelli immediatamente successivi nella struttura tridimensionale della proteina vengono denominati “anello esterno”. I residui amminoacidici dell’“anello esterno” sono essenziali per l’attività catalitica della proteina: il substrato viene legato grazie ai residui His30 e Tyr34, mentre i residui Tyr34, His30 e Gln143 formano legami a H per garantire protoni al cofattore e aiutare lo spostamento degli elettroni durante la reazione catalizzata [155].

Uno studio ha dimostrato come bassi livelli di MnSOD sono correlati con la SM; in particolare, è stato valutato l’impatto di un elevato stress ossidativo causato dall’eliminazione del gene di SOD-2 nei neuroni del midollo spinale di topi. La deplezione di MnSOD ha portato ad alterazioni mitocondriali e alla formazione di perossidi che hanno indotto paralisi, comportamenti riconducibili a un’estesa demielinizzazione, danno assonale, aumento della permeabilità della BEE, elevata infiammazione, attivazione della glia e migrazione dei linfociti verso il SNC. Tutti questi sintomi sono caratteristici delle malattie neurodegenerative e in particolare della SM [156].

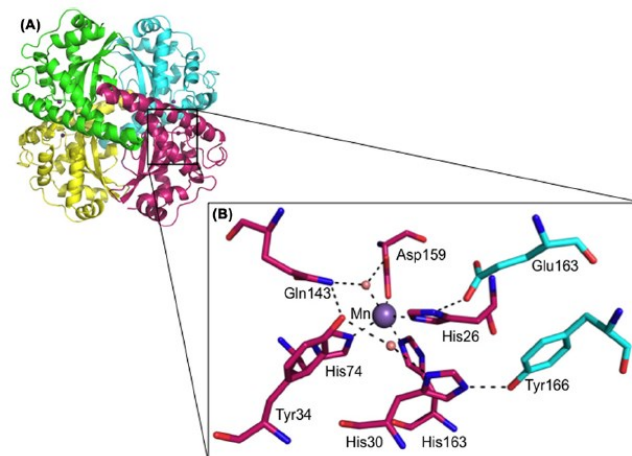


Figura 21: (A) Le quattro subunità (indicate con colori diversi) che formano la proteina MnSOD. (B) Struttura del sito attivo di MnSOD che mostra i legami a H indicati con le linee tratteggiate, gli atomi di ossigeno con i pallini rossi e il cofattore Mn con il pallino viola [155].

SCOPO DELLA TESI

La sclerosi multipla (SM) è una patologia complessa, cronica e autoimmune, caratterizzata da demielinizzazione, neuroinfiammazione e danno neuronale. Si tratta di una malattia in cui sono implicate diverse popolazioni di cellule del sistema immunitario, tra cui linfociti T e B e cellule della microglia.

Ad oggi, le strategie terapeutiche mirano a rallentare la progressione della malattia e a ridurre il numero delle recidive attraverso terapie modificanti la malattia. Sebbene in passato la SM sia stata considerata una malattia mediata solo dalle cellule T, recenti evidenze suggeriscono il ruolo delle cellule B nella sua patogenesi. Per tale ragione, in questi ultimi anni stanno entrando in terapia anticorpi monoclonali diretti contro le cellule B.

Attualmente, uno dei farmaci approvati per il trattamento della forma recidivante remittente è ocrelizumab (OCR), un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro l'antigene CD20 localizzato sulla superficie delle cellule B. OCR esercita un'azione immunomodulatoria: il legame con CD20 causa a livello del SNC la deplezione delle cellule B circolanti che sono coinvolte nella secrezione di citochine pro-infiammatorie, nell'attivazione dei linfociti T pro-infiammatori e nella produzione di anticorpi diretti contro la mielina.

Alcune evidenze hanno mostrato che il legame con CD20 esercita notevoli effetti su una serie di vie intracellulari coinvolte nella sopravvivenza e proliferazione cellulare, tra cui quella della protein-chinasi C (PKC). PKC è una famiglia di serin/treonin chinasi che conta 10 diverse isoforme. È implicata in moltissimi processi cellulari, sia fisiologici sia patologici, quali la regolazione dei recettori delle cellule B, la proliferazione cellulare e l'apoptosi indotta dallo stress ossidativo.

Lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di valutare possibili nuovi meccanismi d'azione dell'anticorpo monoclonale OCR nell'ambito del trattamento della SM. Nello specifico, lo studio è stato focalizzato su neuroinfiammazione e stress ossidativo poiché rappresentano due eventi peculiari nella patogenesi di questa malattia.

In riferimento al processo di neuroinfiammazione, è stata presa in considerazione la cascata che, partendo dall'attivazione di PKC- β II, porta all'aumento del fattore di crescita VEGF attraverso la modulazione di HIF-1 α .

VEGF ha un ruolo complesso nello sviluppo della malattia: nelle fasi iniziali della malattia si comporta come citochina pro-infiammatoria, in quanto la sua produzione favorisce il reclutamento delle cellule del sistema immunitario responsabili della demielinizzazione e del danno assonale; mentre, nelle fasi tardive della malattia, potrebbe anche avere un ruolo neuroprotettivo, in quanto la sua azione pro-angiogenica proteggerebbe il tessuto nervoso dallo stato di ipossia cronico causato dal danneggiamento delle cellule nervose.

Per quanto concerne lo stress ossidativo, sono state esaminate due proteine neuroprotettive: MnSOD, un enzima antiossidante, e HSP70, una chaperonina soprattutto implicata nel facilitare e mantenere il corretto ripiegamento (*folding*) delle proteine. Va sottolineato che i trascritti delle proteine MnSOD e HSP70 sono bersaglio della proteina HuR, una *RNA-binding protein* che sembra svolgere un ruolo cruciale nella SM.

L'obiettivo specifico del presente progetto di tesi è stato quello di esaminare l'effetto di OCR sulla cascata pro-infiammatoria PKC- β II/ HIF-1 α / VEGF e sulle vie neuroprotettive HuR/MnSOD e HSP70 in cellule mononucleate di sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMC) provenienti da pazienti affetti da SM recidivante-remittente. L'analisi dei livelli proteici è stata condotta prima del trattamento con OCR e dopo 12 mesi di terapia, confrontandola con il contenuto proteico misurato in PBMC provenienti da soggetti sani di controllo

MATERIALI E METODI

1. PAZIENTI COINVOLTI NELLO STUDIO CLINICO

In questo studio sono stati arruolati 17 pazienti provenienti dall'IRCCS Istituto Nazionale "C. Mondino" di Pavia con diagnosi di SM recidivante remittente, in accordo con i criteri di McDonald del 2017. La disabilità neurologica dei pazienti è stata quantificata utilizzando la scala EDSS (Expanded Disability Status Scale), mentre l'impatto clinico della malattia è stato calcolato utilizzando la scala di gravità MSSS (Multiple Sclerosis Severity Score). I pazienti (6 uomini e 11 donne, con un'età media di $42,17 \pm 8,44$ anni, e con una durata media della patologia di 10 anni) sono stati arruolati nello studio tra settembre 2021 e giugno 2023 e sono stati trattati con OCR in accordo con le regole di pratica clinica.

Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con recidive recenti e in cura con steroidi nelle 4 settimane precedenti, donne in gravidanza o in allattamento, pazienti allergici a OCR e quelli con comorbidità e infezioni sistemiche attive.

Dei 17 pazienti, 4 erano naïve, cioè non erano stati trattati precedentemente con alcun farmaco specifico per la SM, mentre 13 erano stati trattati con altre DMTs (natalizumab: n=10, fingolimod: n=1, interferone β : n=1).

È stato arruolato anche un gruppo di controlli sani (7 uomini e 10 donne, con un'età media di $42,00 \pm 9,26$ anni), paragonabili per età, sesso ed etnia. Al momento della raccolta dei campioni di sangue, tutti i controlli sono stati valutati privi di qualsiasi tipo di malattia, sia fisica che mentale. Questo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino. Inoltre, tutti i soggetti che hanno preso parte allo studio hanno firmato il consenso informato.

2. ISOLAMENTO DEI PBMC DAL SANGUE PERIFERICO

Le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC; *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) provenienti dai pazienti e dai controlli sani sono state isolate dal sangue periferico prelevato sia prima del trattamento con OCR (T0) che dopo 12 mesi di trattamento (T12). In particolare, i PBMC sono stati ottenuti separando i diversi componenti del sangue per centrifugazione, in gradiente di densità, utilizzando Lymphoprep™ (Voden Medical Instruments SPA).

Ogni campione di sangue è stato diluito in rapporto 1:1 con soluzione fisiologica (0,9% di NaCl), trasferito in un tubo da 50 ml, contenente 15 ml di Lymphoprep™, e centrifugato senza freno a 800 x *g* per 30 minuti. La centrifugazione permette la separazione dei diversi componenti del sangue e la formazione di quattro fasi distinte: lo strato superiore di plasma, l'anello di PBMC, lo strato di Lymphoprep™ e lo strato inferiore di cellule polimorfonucleate (Figura 22).

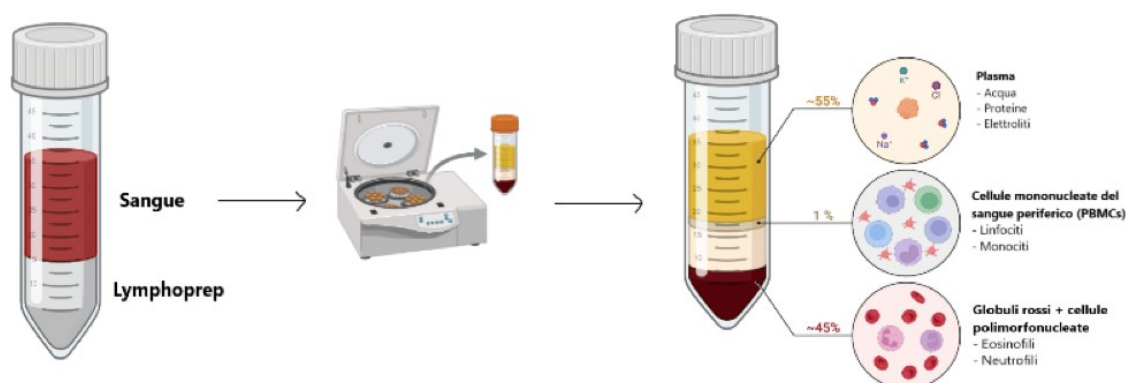


Figura 22: Separazione delle quattro fasi del sangue e isolamento dell'anello di PBMC.

L'anello di PBMC così ottenuto è stato prelevato e trasferito in un tubo da 50 ml dove è stato portato a un volume di 30 ml e lavato con PBS (Phosphate Buffer Saline; Dulbecco). Successivamente, la soluzione è stata centrifugata con freno a 500 x *g* per 10 minuti, il surnatante è stato aspirato e il *pellet* così ottenuto è stato risospeso in una soluzione di FBS (siero fetale bovino) con il 10% di DMSO (dimetilsolfossido). I criotubi contenenti i PBMC sono stati congelati e conservati a -80°C in attesa di ulteriori analisi.

3. WESTERN BLOTTING

Il western blotting è una tecnica biochimica semiquantitativa che permette di determinare la presenza di una proteina di interesse all'interno di un campione, anche complesso, come il lisato cellulare. Questo è possibile utilizzando una corsa elettroforetica, che separa le proteine in base al loro peso molecolare e all'utilizzo di anticorpi mono- o poli-clonali specifici.

3.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I PBMC isolati sono stati scongelati e centrifugati a 500 x *g* per separare il *pellet* di cellule che successivamente è stato risospeso in un tampone di omogeneizzazione (contenente Tris-HCl 20mM, pH = 7.4, EDTA 2mM, EGTA 0,5 mM, 2-β-mercaptoetanololo 50mM, saccarosio 0,32 M) a cui viene addizionato un cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma-Aldrich) alla concentrazione 1:100.

Le cellule sono poi state omogeneizzate direttamente, in tubi da 1,5 ml, con un pestello, sonicate 3 volte per 20 s a circa 30 kHz.

Il contenuto proteico di ogni campione è stato determinato con il metodo di Bradford, utilizzando l'albumina di siero bovino (BSA; Bovine Serum Albumin) come standard per costruire la curva di calibrazione, effettuando una lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 595 nm. I campioni così ottenuti sono stati conservati in freezer a -20°C fino all'utilizzo.

Prima della corsa elettroforetica, ciascun campione è stato diluito in rapporto 1:1 con SDS (sodio dodecilsolfato)-*sample buffer* 2X (contenente Tris-HCl 125 mM, pH = 6,8, SDS 4%, glicerolo 20%, blu di bromofenolo 0,01%, 2-β mercaptoetanolo 6%) e scaldato a 95°C per 5 minuti.

3.2. CORSA ELETTROFORETICA

Questa procedura si basa sulla denaturazione delle proteine ad opera del detergente anionico SDS che, legandosi alle proteine, le carica negativamente, permettendone così la corsa verso l'anodo. Le proteine si separeranno in base al loro peso molecolare: la migrazione delle proteine avviene con una velocità inversamente proporzionale alla loro massa; infatti, quelle più piccole correranno più velocemente, mentre quelle più grandi più lentamente.

La prima fase della corsa elettroforetica consiste nella preparazione del gel, costituito da due diverse parti caratterizzate da differenti pH:

- *Staking gel*: costituito da Tris-HCl 1,5 M (pH = 6.8), poliacrilammide 5%, SDS 0,01%, persolfato di ammonio (APS) 0,01%, e N,N,N,N'-tetrametiletildiammina (TEMED) 0,01%. In questa parte del gel vengono creati tramite specifici "pettini" i pozzetti in cui verranno caricati i campioni. Lo scopo di questa porzione di gel è quella di permettere l'impaccamento dei campioni prima dell'inizio della corsa elettroforetica vera e propria.
- *Running gel*: costituito da Tris-HCl 1,5 M (pH = 8.8), poliacrilammide 12%, SDS 0,1 %, APS 0,05% e TEMED 0,05%. In questa parte del gel, grazie all'applicazione di una differenza di potenziale, le proteine contenute nei campioni vengono separate in base al peso molecolare.

Dopo aver preparato il gel, i campioni sono stati caricati nello staking gel e la corsa elettroforetica è stata condotta a un voltaggio costante di 120 V, a temperatura ambiente, in un tampone di corsa costituito da Tris-HCl 0,025 M, SDS 3,4 mM e glicina 0,2 M. Oltre ai campioni, è stato caricato anche un marcatore di pesi molecolari (EuroClone) in modo da poter seguire la corsa elettroforetica.

Al termine della corsa elettroforetica, le proteine incorporate nel gel di corsa vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa della porosità di 0,2 µm, utilizzando un tampone di trasferimento contenente Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,2 M, metanolo 20% e SDS 0,2%, a 4°C per 2 ore e con un passaggio di corrente di 250 mA. Il trasferimento è permesso grazie alla presenza di SDS che carica negativamente le proteine e all'applicazione di una differenza di potenziale che ne permette la migrazione dal gel di corsa alla membrana di nitrocellulosa.

Al termine del trasferimento, le membrane vengono colorate con il rosso *ponceau* che permette la visualizzazione di tutte le proteine presenti nei campioni. Questo passaggio è importante perché il contenuto totale delle proteine verrà utilizzato per normalizzare i valori delle proteine di interesse. Successivamente, le membrane sono state lavate e incubate per 1 ora, a temperatura ambiente, in una soluzione al 6% di latte in polvere in tampone TBST (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 0,1% e pH = 7.5), per permettere il blocco dei siti aspecifici.

Dopo questa fase, le proteine devono essere identificate: ciò è possibile attraverso l'utilizzo di specifici anticorpi, primari e secondari. L'anticorpo primario lega la proteina di interesse, mentre l'anticorpo secondario, coniugato all'enzima perossidasi di rafano, lega l'anticorpo primario e ne permette la quantificazione tramite una reazione di chemiluminescenza.

Nello specifico, le membrane sono state incubate tutta la notte a 4°C, sotto agitazione, con l'anticorpo primario, diluito nella soluzione di blocco (latte in polvere al 6% in tampone TBST). Gli anticorpi utilizzati sono stati i seguenti:

- *Anti-PKC β II (Santa Cruz)*: anticorpo monoclonale prodotto in topo diluito 1:1000
- *Anti-HIF 1α (Cell Signaling)*: anticorpo monoclonale prodotto in topo diluito 1:500
- *Anti-VEGF (Santa Cruz)*: anticorpo monoclonale prodotto in coniglio diluito 1:750
- *Anti-HuR (Santa Cruz)*: anticorpo monoclonale prodotto in topo diluito 1:1000
- *Anti-MnSOD (Santa Cruz)*: anticorpo monoclonale prodotto in topo diluito 1:200
- *Anti-Hsp70 (Santa Cruz)*: anticorpo monoclonale prodotto in topo diluito 1:1000

Il giorno seguente, le membrane sono state sottoposte a 4 lavaggi, di 10 minuti ciascuno, con tampone TBST e successivamente sono state incubate con l'anticorpo secondario per 1 ora a temperatura ambiente. Anche l'anticorpo secondario è stato diluito nella soluzione di blocco. Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati:

- Anti-mouse: con una diluzione di 1:2000
- Anti-rabbit: con una diluzione di 1:3000

Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario, sono stati condotti 3 lavaggi, di 10 minuti ciascuno in tampone TBST. Dopo l'ultimo lavaggio la membrana viene bagnata con una soluzione ECL (elettrochemiluminescenza; *western bright ECL-ADVASTA*) in rapporto 1:1, per permettere la reazione di chemiluminescenza con l'anticorpo secondario e la rilevazione delle bande relative alle proteine di interesse attraverso l'utilizzo di uno sviluppatore (Amersham Imager 680) (Figura 23).

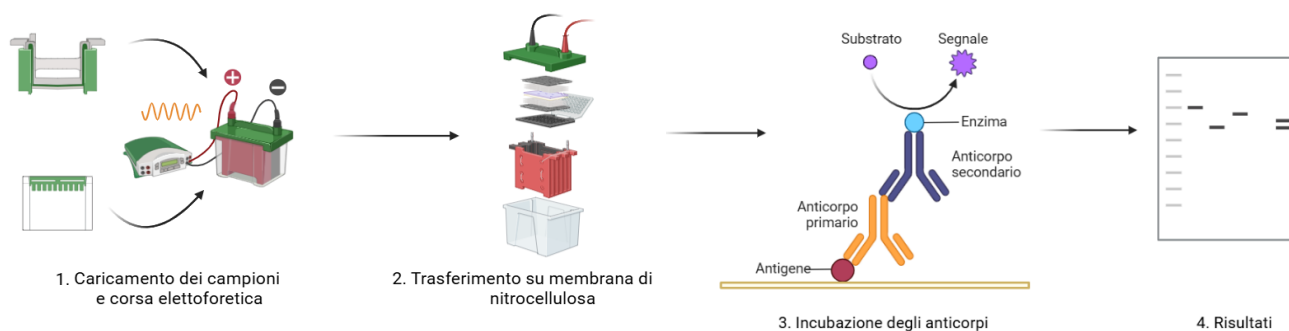


Figura 23: Fasi del western blotting: 1. Preparazione del gel e caricamento dei campioni 2. Trasferimento 3. Incubazione con gli anticorpi 4. Rilevazione delle bande delle proteine.

4. ANALISI STATISTICA

I dati del western blotting sono stati ottenuti attraverso il programma ImageJ tramite analisi densitometrica delle immagini ottenute con lo sviluppatore, utilizzando i valori ottenuti dopo la colorazione con il rosso ponceau (30-95 kDa) per la normalizzazione.

Le analisi statistiche sono state condotte attraverso l'utilizzo del software GraphPad Prism (versione 10). I dati sono stati analizzati mediante l'utilizzo del test non-parametrico di Mann-Whitney nel caso di campioni indipendenti (controlli vs T0 e controlli vs T12), oppure del test di Wilcoxon nel caso di campioni appaiati (T0 vs T12). Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

In questo studio sono stati arruolati 17 pazienti con diagnosi di sclerosi multipla recidivante remittente che sono stati sottoposti a trattamento con l'anticorpo monoclonale ocrelizumab diretto contro il recettore CD20 presente sulla membrana cellulare dei linfociti B.

Dai dati di letteratura, gli anticorpi monoclonali diretti contro il recettore CD20 si stanno rivelando interessanti, in quanto sembrano agire anche su altri *pathways* intracellulari che potrebbero risultare utili nell'ambito del trattamento della SM.

Nel lavoro sono state prese in considerazione due cascate di trasduzione del segnale, rispettivamente legate alla neuroinfiammazione e allo stress ossidativo al fine di esplorare se possano essere nuovi bersagli di ocrelizumab. In particolare, sono state valutate la cascata pro-infiammatoria PKC- β II/ HIF-1 α /VEGF e la cascata neuroprotettiva HuR/MnSOD e HSP70 in cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC).

1. ESPRESSIONE DI PKC- β II IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON OCR

Il primo obiettivo di questo studio è stato la valutazione, attraverso esperimenti di *western blotting*, dei livelli proteici di PKC- β II nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con OCR (T0) rispetto ai controlli sani (CS).

Come è possibile vedere in Figura 24A, si assiste ad un aumento statisticamente significativo dell'espressione di PKC- β II nei pazienti T0 rispetto ai controlli sani.

L'espressione di PKC- β II è stata successivamente valutata nei campioni derivati da pazienti sottoposti al trattamento con OCR per 12 mesi (T12). Come si può osservare in Figura 24B l'espressione di PKC- β II è diminuita significativamente dopo un anno di terapia.

Inoltre, il trattamento per 12 mesi con OCR riporta i livelli della proteina a valori simili a quelli dei controlli sani (Figura 24C).

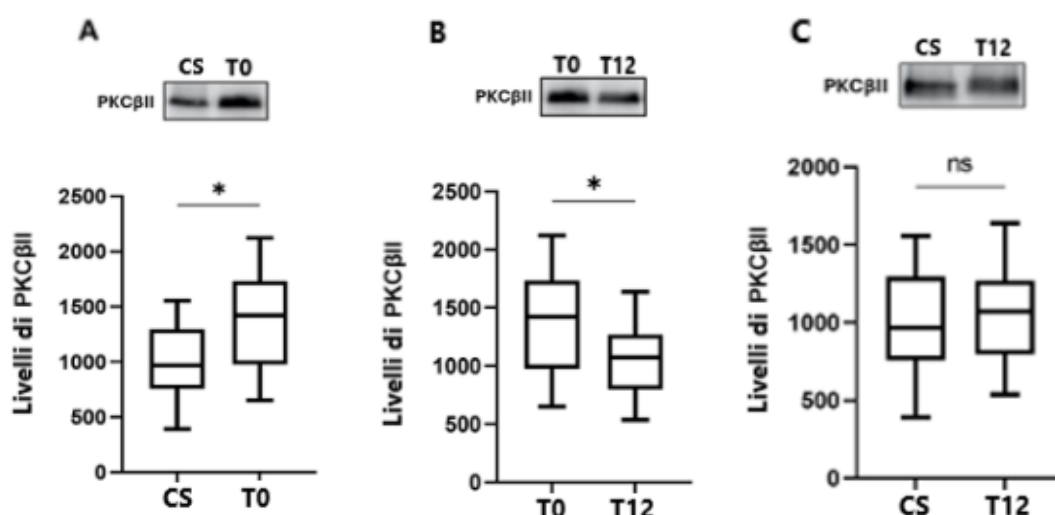


Figura 24: (A) Confronto tra l'espressione di PKC-β II nei controlli sani (CS) e nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con OCR (T0). (B) Confronto tra l'espressione di PKC-β II nei pazienti affetti da SM prima (T0) e dopo un anno di trattamento con OCR (T12). (C) Confronto tra l'espressione di PKC-β II nei controlli sani e nei pazienti al T12. Nel box-plot sono riportati il 25° percentile, la mediana e il 75° percentile. I dati sono stati analizzati utilizzando il test di Wilcoxon (B) o il test di Mann-Whitney (A e C). * $p \leq 0,05$. OCR = ocrelizumab.

2. CASCATA INFIAMMATORIA ED EFFETTO DI OCRELIZUMAB

La cascata infiammatoria che è stata presa in esame vede, a monte, l'attivazione di PKC-βII che ha come bersaglio il fattore di trascrizione HIF-1α, il quale, a sua volta, influenza positivamente la produzione di VEGF.

Per prima cosa sono state confrontate le quantità di proteine HIF-1α e VEGF tra i controlli sani e i pazienti T0 (Figura 25A e B).

Come si vede dai grafici, l'aumento di PKC-βII, precedentemente osservato nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con OCR (T0), si riflette in un incremento statisticamente significativo del contenuto sia di HIF-1α che di VEGF.

Successivamente, è stato valutato l'effetto di OCR su questa cascata dopo un anno di terapia.

Similmente a quanto osservato per PKC-βII, il contenuto di HIF-1α diminuisce dopo 12 mesi di trattamento con OCR (Figura 26A). Inoltre, la quantità di proteina nei PBMC provenienti dai pazienti al T12 non differisce da quella presente nei campioni provenienti dai controlli sani, evidenziando che

il trattamento con OCR riporta la produzione di questo fattore di trascrizione a una condizione simile a quella di un soggetto sano (Figura 26B).

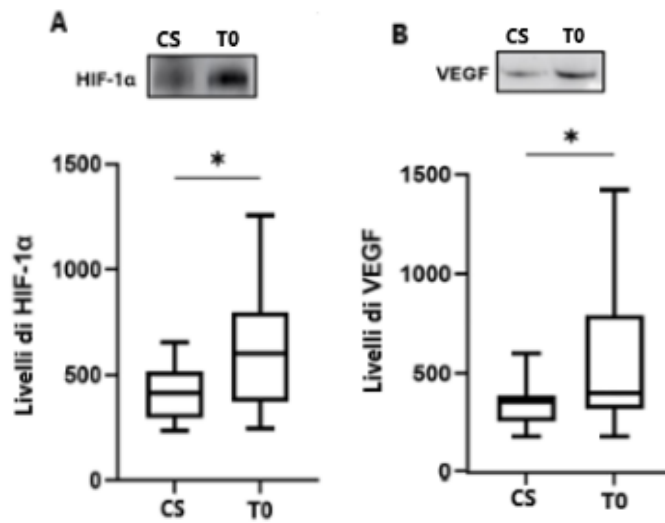


Figura 25: (A) Confronto tra l'espressione di HIF-1α nei controlli sani (CS) e nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con OCR (T0). (B) Confronto tra l'espressione di VEGF nei controlli sani e nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con OCR (T0). Nel box-plot sono riportati il 25° percentile, la mediana e il 75° percentile. I dati sono stati analizzati con il test di Wilcoxon. * $p \leq 0,05$. OCR = ocrelizumab.

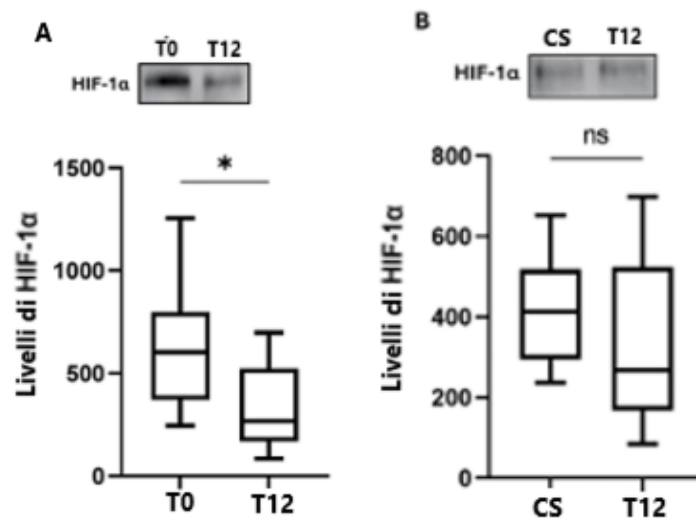


Figura 26: (A): Confronto tra l'espressione di HIF-1α nei pazienti affetti da SM prima (T0) e dopo il trattamento con OCR (T12). (B): Confronto tra l'espressione di HIF-1α nei pazienti al T12 e nei controlli sani (CS). Nel box-plot sono riportati il 25° percentile, la mediana e il 75° percentile. I dati sono stati analizzati tramite il test di Wilcoxon (A) o con il test di Mann-Whitney (B). * $p \leq 0,05$. OCR = ocrelizumab.

La diminuzione del fattore di trascrizione HIF-1 α dopo trattamento per 12 mesi con OCR fa sì che anche il suo *target* VEGF venga prodotto in quantità minore. Infatti, come si osserva in Figura 25A, la quantità di proteina VEGF presente nei PBMC provenienti dai pazienti al T12 è significativamente inferiore a quella riscontrata nei campioni prelevati al T0.

Come per HIF-1 α , il trattamento con OCR riporta i valori di VEGF a livelli comparabili a quelli osservati nei PBMC provenienti dai soggetti sani (Figura 27B).

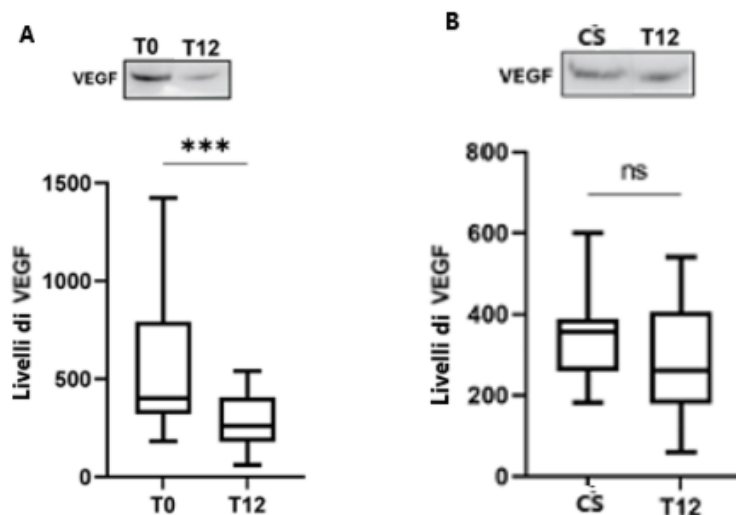


Figura 27: (A): Confronto tra l'espressione di VEGF nei pazienti affetti da SM prima (T0) e dopo 12 mesi di trattamento con OCR (T12). (B): Confronto tra l'espressione di VEGF nei pazienti al T12 e nei controlli sani (CS). Nel box-plot sono riportati il 25° percentile, la mediana e il 75° percentile. I dati sono analizzati mediante il test di Wilcoxon (A) o mediante il test di Mann-Whitney (B). *** $p \leq 0,001$. OCR = ocrelizumab.

3. RUOLO DI HuR NELLO SVILUPPO DELLA SM

In lavori precedenti, il laboratorio di ricerca presso cui ho svolto il tirocinio di tesi aveva già dimostrato sia il ruolo della proteina HuR che quello delle proteine MnSOD e HSP70 nello sviluppo della SM. Inoltre, attraverso studi sul trascritto delle proteine MnSOD e HSP70, era stato anche documentato come gli mRNA di queste due proteine possano essere bersaglio di HuR grazie alla presenza di sequenze ARE.

Come è possibile notare in Figura 28A, si assiste a una diminuzione statisticamente significativa dell'espressione di HuR nei PBMC dei campioni derivati dai pazienti al T0 rispetto ai controlli sani. Il trattamento con OCR per 12 mesi determina un aumento significativo dell'espressione di HuR (Figura

28B). Inoltre, il trattamento per 12 mesi con OCR riporta i livelli della proteina a valori simili a quelli dei controlli sani (Figura 28C).

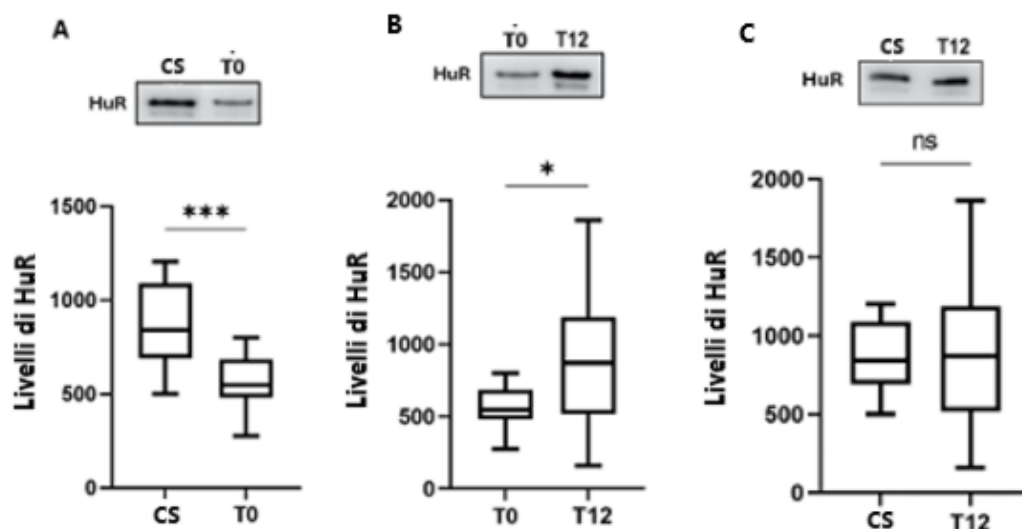


Figura 28: (A): Confronto tra l'espressione di HuR nei controlli sani (CS) e nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con OCR (T0). (B): Confronto tra l'espressione di HuR nei pazienti prima (T0) e dopo 12 mesi di trattamento con OCR (T12). (C): Confronto tra l'espressione di HuR nei pazienti al T12 e nei controlli sani. Nel box-plot sono riportati il 25° percentile, la mediana e il 75° percentile. I dati sono stati analizzati tramite il test di Wilcoxon (B) o tramite il test di Mann-Whitney (A e C). * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. OCR = ocrelizumab.

Successivamente è stata valutata anche l'espressione delle proteine HSP70 e MnSOD nei PBMC ottenuti dai controlli sani e da pazienti al T0. Come si osserva in Figura 29 entrambe le proteine sono significativamente meno espresse in seguito all'insorgenza della patologia.

In seguito, si è passati a valutare la diversa concentrazione di queste proteine nei PBMC provenienti dai pazienti al T12.

Come si può riscontrare nelle Figure 30A e 30B, i valori delle due proteine aumentano dopo trattamento per 12 mesi con l'anticorpo monoclonale, tuttavia l'incremento raggiunge la significatività statistica solo nel caso di HSP70.

Non ci sono invece differenze significative tra il contenuto proteico di MnSOD e HSP70 nei pazienti al T12 e nei controlli sani, indicando quindi che i livelli di queste due proteine importanti nel contrastare lo stress ossidativo sono ristabiliti a valori simili a quelli dei controlli sani dopo 12 mesi di trattamento con OCR (Figura 30C e 30D).

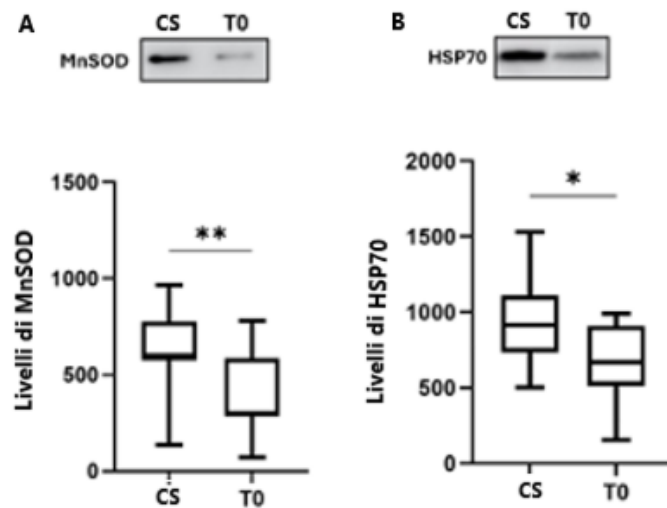


Figura 29: (A): Confronto tra l'espressione di MnSOD nei controlli sani (CS) e nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con OCR (T0). (B): Confronto tra l'espressione di HSP70 nei controlli sani e nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con OCR (T0). Nel box-plot sono riportati il 25° percentile, la mediana e il 75° percentile. I dati sono stati analizzati attraverso il test di Mann-Whitney. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0,01$. OCR = ocrelizumab.

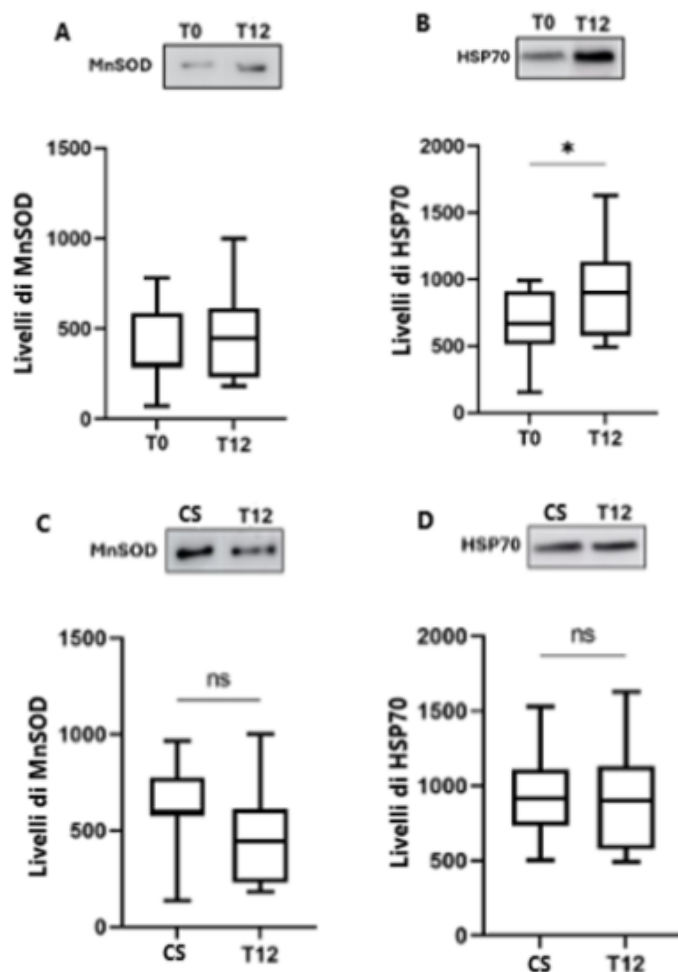


Figura 30: (A): Confronto tra l'espressione di MnSOD nei pazienti affetti da SM prima (T0) e dopo 12 mesi di trattamento con OCR (T12). (B): Confronto tra l'espressione di HSP70 nei pazienti affetti da SM prima (T0) e dopo 12 mesi di trattamento con OCR (T12). (C): Confronto tra l'espressione di MnSOD nei pazienti al T12 e nei controlli sani (CS). (D): Confronto tra l'espressione di HSP70 nei pazienti al T12 e nei controlli sani. Nel box-plot sono riportati il 25° percentile, la mediana e il 75° percentile. I dati sono stati analizzati attraverso il test di Wilcoxon (A e B) o attraverso il test di Mann-Whitney (C e D). * $p \leq 0,05$. OCR = ocrelizumab.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

La sclerosi multipla è una patologia cronica autoimmune del SNC, caratterizzata da meccanismi di patogenesi complessi che comprendono infiammazione a livello del SNC (neuroinfiammazione) e neurodegenerazione derivanti da un'alterata risposta immunitaria. Il primo evento patogenico che si verifica è un danno a livello della barriera ematoencefalica che fa sì che le cellule del sistema immunitario riescano a raggiungere il tessuto nervoso in maniera incontrollata. I linfociti T e B, i macrofagi e le cellule della microglia attivate dal processo infiammatorio sono i responsabili della propagazione del processo infiammatorio stesso e della produzione di auto-anticorpi diretti contro peptidi *self* come la mielina. L'attacco da parte del sistema immunitario della mielina porta innanzitutto a un rallentamento della conduzione dei segnali nervosi e in secondo luogo al danno assonale e alla perdita degli oligodendrociti; si formano così le caratteristiche placche che portano a sintomi diversi in base alla localizzazione e alle aree cerebrali coinvolte.

La SM è una patologia multifattoriale, la cui eziologia comprende fattori ambientali, genetici e immunologici che concorrono a formare un quadro molto complesso. Fino a poco tempo fa si pensava che il danno al tessuto nervoso ad opera del sistema immunitario dell'individuo stesso fosse mediato principalmente dalle cellule T. Recentemente, si è invece dimostrata la centralità delle cellule B come mediatori dell'attacco e distruzione della mielina, in particolare nel rilascio di citochine e chemochine pro-infiammatorie e nella produzione di plasmacellule che secernono gli auto-anticorpi. Il ruolo delle cellule B è stato indagato più estesamente in seguito ai risultati ottenuti con il trattamento dei pazienti con anticorpi monoclonali diretti contro uno dei loro antigeni, il CD20. In questo contesto, si è pensato di investigare ulteriormente due cascate proteiche implicate nei processi di neuroinfiammazione e di stress ossidativo e di valutare il possibile effetto del trattamento con un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore CD20 dei linfociti B, ocrelizumab.

Gli esperimenti sono stati condotti su PBMC isolati dal sangue proveniente da prelievo venoso dei pazienti con diagnosi di SM recidivante remittente in cura presso il centro "C. Mondino" e successivamente quantificando l'espressione di diverse proteine attraverso l'utilizzo della tecnica di *western blotting*. I risultati così ottenuti sono stati confrontati con i valori riscontrati nei PBMC di soggetti sani.

La prima cascata proteica presa in considerazione è PKC- β II/HIF-1 α /VEGF. Si è scelto di valutare l'espressione di queste proteine perché da dati di letteratura era già stato dimostrato che gli anticorpi

monoclonali diretti contro CD20 sembrano agire anche su *pathways* intracellulari in cui sono implicate le chinasi. PKC-βII è una proteina ubiquitaria implicata in molti processi sia fisiologici che patologici come la regolazione della trascrizione, della proliferazione delle cellule endoteliali e dell'apoptosi indotta dallo stress ossidativo. Viene attivata da Ca²⁺ e diacilglicerolo (DAG) in presenza di fosfatidilserina ed è in grado di attivare a sua volta altre proteine, tra cui il fattore di trascrizione HIF-1α. In particolare, HIF-1α regola, tra molti altri, il gene che codifica per la proteina VEGF, ed è stato precedentemente dimostrato come questo fattore di crescita, soprattutto alcune sue isoforme come VEGF-A, sia implicato nell'insorgenza della SM. VEGF sembra avere un duplice ruolo nella patologia: nelle prime fasi, promuovendo l'angiogenesi, favorisce il reclutamento delle cellule del sistema immunitario e quindi il processo di neuroinfiammazione; nelle fasi più avanzate della malattia, invece, potrebbe avere un ruolo neuroprotettivo contro lo stato di ipossia cronico dovuto al danno del tessuto nervoso.

Per prima cosa, questo studio dimostra nuovamente che i livelli di PKC-β II sono modificati nei pazienti affetti da SM prima del trattamento con anticorpi monoclonali contro CD20 (pazienti al T0): la proteina viene prodotta in misura maggiore rispetto ai controlli sani. Tuttavia, in seguito alla somministrazione di OCR (pazienti al T12), la produzione della proteina PKC-β II è significativamente diminuita. Degno di nota è il fatto che non ci siano differenze di espressione tra i controlli sani e i pazienti al T12, dimostrando che i livelli di proteina siano tornati a valori paragonabili a quelli di un individuo sano.

Successivamente, sono state studiate le proteine HIF-1α e VEGF: entrambe seguono un andamento simile a quello di PKC-β II, infatti sono più espresse nei soggetti malati al T0 rispetto ai controlli sani e la loro concentrazione diminuisce in seguito al trattamento con OCR che riporta i livelli a quelli osservati nei soggetti sani.

Questo suggerisce che OCR agisce sulla neuroinfiammazione, riducendo verosimilmente l'attivazione delle cellule del sistema immunitario auto-reattive e diminuendo il danno al tessuto nervoso.

La seconda cascata proteica presa in considerazione è quella implicata nello stress ossidativo: HuR/MnSOD e HSP70. Come è stato precedentemente dimostrato da studi condotti nel laboratorio in cui ho svolto il tirocinio, l'*RNA binding protein* HuR è implicata nello sviluppo della SM. Questa proteina influenza differentemente la produzione proteica delle cellule in base alla natura degli

stimoli agendo a livello post-trascrizionale. In particolare, è in grado di legare specifici mRNA e di influenzarne la stabilità e/o la velocità di traduzione portando a una minore o maggiore quantità di proteina. Di interesse è il fatto che due tra i suoi *target* sono gli mRNA delle proteine MnSOD e HSP70. La prima è un antiossidante enzimatico che interviene per prevenire i danni alla cellula provocati dall'alta concentrazione di ROS catalizzando la reazione di neutralizzazione dello ione superossido, mentre HSP70 è una *chaperonina* che si occupa di marcare e trasportare al proteasoma le proteine danneggiate in condizioni di stress ossidativo, per eliminarle.

Per prima cosa è stata valutata l'espressione della proteina HuR: nei pazienti malati i livelli di proteina sono più bassi rispetto ai controlli sani, mentre dopo trattamento con OCR per 12 mesi i livelli risalgono a valori paragonabili a quelli dei soggetti sani.

I livelli di MnSOD e HSP70 seguono l'andamento di HuR: nei pazienti malati, dove lo stress ossidativo è maggiore, i livelli sono più bassi; mentre, dopo trattamento con OCR, il contenuto proteico viene riportato a quello osservato nei soggetti sani. I risultati ottenuti su questa seconda cascata proteica dimostrano come OCR sia attivo anche nel migliorare la condizione di stress ossidativo limitando quindi, per quanto possibile, il danno al tessuto nervoso dei pazienti malati.

In conclusione, in questo studio sono stati dimostrati due nuovi possibili meccanismi d'azione dell'anticorpo monoclonale ocrelizumab in pazienti affetti da SM: antinfiammatorio e neuroprotettivo. Questi meccanismi molecolari, in aggiunta all'effetto di ocrelizumab sui linfociti B, potrebbero quindi contribuire a contrastare la progressione della malattia. Come prospettive future, si potrebbe sicuramente ampliare sia il numero di pazienti presi in considerazione nello studio sia valutare le stesse cascate anche in tempi successivi (ad esempio dopo 24 mesi di terapia). Sarebbe inoltre interessante considerare, oltre all'espressione proteica, anche le variazioni della trascrizione di questi geni attraverso la quantificazione dell'mRNA.

BIBLIOGRAFIA

1. Kumar, V.; Abbas, A.K.; Aster, J.C. *Robbins - Fondamenti Di Patologia e Di Fisiopatologia*; IX ed.; Edra; ISBN 978-88-214-3708-3.
2. Mottahedin, A.; Ardalan, M.; Chumak, T.; Riebe, I.; Ek, J.; Mallard, C. Effect of Neuroinflammation on Synaptic Organization and Function in the Developing Brain: Implications for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 190, doi:10.3389/fncel.2017.00190.
3. Chagas, L. da S.; Trindade, P.; Gomes, A.L.T.; Mendonça, H.R.; Campello-Costa, P.; Faria Melibe, A. da C.; Linden, R.; Serfaty, C.A. Rapid Plasticity of Intact Axons Following a Lesion to the Visual Pathways during Early Brain Development Is Triggered by Microglial Activation. *Exp. Neurol.* **2019**, *311*, 148–161, doi:10.1016/j.expneurol.2018.10.002.
4. Heldin, C.-H.; Lu, B.; Evans, R.; Gutkind, J.S. Signals and Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a005900, doi:10.1101/cshperspect.a005900.
5. Kölliker-Frers, R.; Udovin, L.; Otero-Losada, M.; Kobiec, T.; Herrera, M.I.; Palacios, J.; Razzitte, G.; Capani, F. Neuroinflammation: An Integrating Overview of Reactive-Neuroimmune Cell Interactions in Health and Disease. *Mediators Inflamm.* **2021**, *2021*, 9999146, doi:10.1155/2021/9999146.
6. Conductier, G.; Blondeau, N.; Guyon, A.; Nahon, J.-L.; Rovère, C. The Role of Monocyte Chemoattractant Protein MCP1/CCL2 in Neuroinflammatory Diseases. *J. Neuroimmunol.* **2010**, *224*, 93–100, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.05.010.
7. Ramesh, G.; MacLean, A.G.; Philipp, M.T. Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*, 480739, doi:10.1155/2013/480739.
8. Andersen, H.H.; Johnsen, K.B.; Moos, T. Iron Deposits in the Chronically Inflamed Central Nervous System and Contributes to Neurodegeneration. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2013**, *71*, 1607–1622, doi:10.1007/s00018-013-1509-8.
9. Ginhoux, F.; Lim, S.; Hoeffel, G.; Low, D.; Huber, T. Origin and Differentiation of Microglia. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 45, doi:10.3389/fncel.2013.00045.
10. Tian, L.; Ma, L.; Kaarela, T.; Li, Z. Neuroimmune Crosstalk in the Central Nervous System and Its Significance for Neurological Diseases. *J. Neuroinflammation* **2012**, *9*, 155, doi:10.1186/1742-2094-9-155.
11. Boutin, H.; LeFeuvre, R.A.; Horai, R.; Asano, M.; Iwakura, Y.; Rothwell, N.J. Role of IL-1 α and IL-1 β in Ischemic Brain Damage.
12. Pekny, M.; Pekna, M.; Messing, A.; Steinhäuser, C.; Lee, J.-M.; Parpura, V.; Hol, E.M.; Sofroniew, M.V.; Verkhratsky, A. Astrocytes: A Central Element in Neurological Diseases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2016**, *131*, 323–345, doi:10.1007/s00401-015-1513-1.
13. Peferoen, L.; Kipp, M.; Valk, P.; Noort, J.M.; Amor, S. Oligodendrocyte-Microglia Cross-Talk in the Central Nervous System. *Immunology* **2014**, *141*, 302–313, doi:10.1111/imm.12163.
14. Erickson, M.A.; Dohi, K.; Banks, W.A. Neuroinflammation: A Common Pathway in CNS Diseases as Mediated at the Blood-Brain Barrier. *Neuroimmunomodulation* **2012**, *19*, 121–130, doi:10.1159/000330247.
15. Abbott, N.J. Dynamics of CNS Barriers: Evolution, Differentiation, and Modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2005**, *25*, 5–23, doi:10.1007/s10571-004-1374-y.
16. Kadry, H.; Noorani, B.; Cucullo, L. A Blood–Brain Barrier Overview on Structure, Function, Impairment, and Biomarkers of Integrity. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 69, doi:10.1186/s12987-020-00230-3.
17. Martini; Tallisch; Nath *Anatomia Umana*; VII ed.; Edises; ISBN 978-88-331-9025-9.
18. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and Function of the Blood-Brain Barrier. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13–25, doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030.
19. Pardridge, W.M. Blood-Brain Barrier Endogenous Transporters as Therapeutic Targets: A New Model for Small Molecule CNS Drug Discovery. *Expert Opin. Ther. Targets* **2015**, *19*, 1059–1072, doi:10.1517/14728222.2015.1042364.
20. Liebner, S.; Czupalla, C.J.; Wolburg, H. Current Concepts of Blood-Brain Barrier Development. *Int. J. Dev. Biol.* **2011**, *55*, 467–476, doi:10.1387/ijdb.103224sl.

21. Armulik, A.; Genov , G.; Betsholtz, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 193–215, doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001.
22. Sofroniew, M.V.; Vinters, H.V. Astrocytes: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2010**, *119*, 7–35, doi:10.1007/s00401-009-0619-8.
23. Clarke, L.E.; Barres, B.A. Emerging Roles of Astrocytes in Neural Circuit Development. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 311–321, doi:10.1038/nrn3484.
24. Glezer, I.; Simard, A.R.; Rivest, S. Neuroprotective Role of the Innate Immune System by Microglia. *Neuroscience* **2007**, *147*, 867–883, doi:10.1016/j.neuroscience.2007.02.055.
25. Engelhardt, B.; Wolburg, H. Mini-Review: Transendothelial Migration of Leukocytes: Through the Front Door or around the Side of the House? *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 2955–2963, doi:10.1002/eji.200425327.
26. Ghorbani, S.; Yong, V.W. The Extracellular Matrix as Modifier of Neuroinflammation and Remyelination in Multiple Sclerosis. *Brain* **2021**, *144*, 1958–1973, doi:10.1093/brain/awab059.
27. Haylock-Jacobs, S.; Keough, M.B.; Lau, L.; Yong, V.W. Chondroitin Sulphate Proteoglycans: Extracellular Matrix Proteins That Regulate Immunity of the Central Nervous System. *Autoimmun. Rev.* **2011**, *10*, 766–772, doi:10.1016/j.autrev.2011.05.019.
28. Silver, J.; Miller, J.H. Regeneration beyond the Glial Scar. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 146–156, doi:10.1038/nrn1326.
29. Schachtrup, C.; Ryu, J.K.; Helmrick, M.J.; Vagena, E.; Galanakis, D.K.; Degen, J.L.; Margolis, R.U.; Akassoglou, K. Fibrinogen Triggers Astrocyte Scar Formation by Promoting the Availability of Active TGF- β after Vascular Damage. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 5843–5854, doi:10.1523/JNEUROSCI.0137-10.2010.
30. Sobel, R.A. The Extracellular Matrix in Multiple Sclerosis Lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1998**, *57*, 205–217, doi:10.1097/00005072-199803000-00001.
31. Tretter, V.; Hochreiter, B.; Zach, M.L.; Krenn, K.; Klein, K.U. Understanding Cellular Redox Homeostasis: A Challenge for Precision Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *23*, 106, doi:10.3390/ijms23010106.
32. Pegoretti, V.; Swanson, K.A.; Bethea, J.R.; Probert, L.; Eisel, U.L.M.; Fischer, R. Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 7191080, doi:10.1155/2020/7191080.
33. Bhattacharyya, A.; Chattopadhyay, R.; Mitra, S.; Crowe, S.E. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 329–354, doi:10.1152/physrev.00040.2012.
34. Teleanu, D.M.; Niculescu, A.-G.; Lungu, I.I.; Radu, C.I.; Vlad cenco, O.; Roza, E.; Cost chescu, B.; Grumezescu, A.M.; Teleanu, R.I. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5938, doi:10.3390/ijms23115938.
35. Nelson, D.L.; Cox, M.M. *I Principi Di Biochimica Di Lehninger*; VII ed.; Zanichelli;
36. Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alex. J. Med.* **2018**, *54*, 287–293, doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001.
37. Panahi, Y.; Rajaei, S.M.; Johnston, T.P.; Sahebkar, A. Neuroprotective Effects of Antioxidants in the Management of Neurodegenerative Disorders: A Literature Review. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 2742–2748, doi:10.1002/jcb.26536.
38. Kocot, J.; Luchowska-Kocot, D.; Kie czykowska, M.; Musik, I.; Kurzepa, J. Does Vitamin C Influence Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders? *Nutrients* **2017**, *9*, 659, doi:10.3390/nu9070659.
39. Hern ndez-Camacho, J.D.; Bernier, M.; L pez-Lluch, G.; Navas, P. Coenzyme Q10 Supplementation in Aging and Disease. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fphys.2018.00044.
40. Khan, H.; Ullah, H.; Aschner, M.; Cheang, W.S.; Akkol, E.K. Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer’s Disease. *Biomolecules* **2020**, *10*, 59, doi:10.3390/biom10010059.
41. Zaplati , E.; Bule, M.; Shah, S.Z.A.; Uddin, Md.S.; Niaz, K. Molecular Mechanisms Underlying Protective Role of Quercetin in Attenuating Alzheimer’s Disease. *Life Sci.* **2019**, *224*, 109–119, doi:10.1016/j.lfs.2019.03.055.

42. Tardiolo, G.; Bramanti, P.; Mazzon, E. Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* **2018**, *23*, 3305, doi:10.3390/molecules23123305.
43. He, X.; Chen, M.G.; Ma, Q. Activation of Nrf2 in Defense against Cadmium-Induced Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1375–1383, doi:10.1021/tx800019a.
44. Wardyn, J.D.; Ponsford, A.H.; Sanderson, C.M. Dissecting Molecular Cross-Talk between Nrf2 and NF- κ B Response Pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 621–626, doi:10.1042/BST20150014.
45. Wang, B.; Wang, Y.; Zhang, J.; Hu, C.; Jiang, J.; Li, Y.; Peng, Z. ROS-Induced Lipid Peroxidation Modulates Cell Death Outcome: Mechanisms behind Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Arch. Toxicol.* **2023**, *97*, 1439–1451, doi:10.1007/s00204-023-03476-6.
46. Davies, K.J.; Delsignore, M.E.; Lin, S.W. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. II. Modification of Amino Acids. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9902–9907, doi:10.1016/S0021-9258(18)48019-2.
47. Waris, G.; Ahsan, H. Reactive Oxygen Species: Role in the Development of Cancer and Various Chronic Conditions. *J. Carcinog.* **2006**, *5*, 14, doi:10.1186/1477-3163-5-14.
48. Halliwell, B. Oxidative Stress and Neurodegeneration: Where Are We Now? *J. Neurochem.* **2006**, *97*, 1634–1658, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x.
49. Adamczyk-Sowa, M.; Galiniak, S.; Żyracka, E.; Grzesik, M.; Naparło, K.; Sowa, P.; Bartosz, G.; Sadowska-Bartos, I. Oxidative Modification of Blood Serum Proteins in Multiple Sclerosis after Interferon Beta and Melatonin Treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 7905148, doi:10.1155/2017/7905148.
50. Mahad, D.J.; Ziabreva, I.; Campbell, G.; Lax, N.; White, K.; Hanson, P.S.; Lassmann, H.; Turnbull, D.M. Mitochondrial Changes within Axons in Multiple Sclerosis. *Brain J. Neurol.* **2009**, *132*, 1161–1174, doi:10.1093/brain/awp046.
51. Haider, L.; Fischer, M.T.; Frischer, J.M.; Bauer, J.; Höftberger, R.; Botond, G.; Esterbauer, H.; Binder, C.J.; Witzum, J.L.; Lassmann, H. Oxidative Damage in Multiple Sclerosis Lesions. *Brain* **2011**, *134*, 1914–1924, doi:10.1093/brain/awr128.
52. van der Goes, A.; Brouwer, J.; Hoekstra, K.; Roos, D.; van den Berg, T.K.; Dijkstra, C.D. Reactive Oxygen Species Are Required for the Phagocytosis of Myelin by Macrophages. *J. Neuroimmunol.* **1998**, *92*, 67–75, doi:10.1016/S0165-5728(98)00175-1.
53. Giovannoni, G.; Silver, N.C.; O’Riordan, J.; Miller, R.F.; Heales, S.J.; Land, J.M.; Elliot, M.; Feldmann, M.; Miller, D.H.; Thompson, E.J. Increased Urinary Nitric Oxide Metabolites in Patients with Multiple Sclerosis Correlates with Early and Relapsing Disease. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **1999**, *5*, 335–341, doi:10.1177/135245859900500506.
54. Number of People with MS | Atlas of MS Available online: <https://www.atlasofms.org/map/united-kingdom/epidemiology/number-of-people-with-ms#about> (accessed on 7 October 2024).
55. Dobson, R.; Giovannoni, G. Multiple Sclerosis – a Review. *Eur. J. Neurol.* **2019**, *26*, 27–40, doi:10.1111/ene.13819.
56. Ad, S.; Pa, B. The Familial Nature of Multiple Sclerosis: Age-Corrected Empiric Recurrence Risks for Children and Siblings of Patients. *Neurology* **1988**, *38*, doi:10.1212/wnl.38.6.990.
57. Willer, C.J.; Dyment, D.A.; Risch, N.J.; Sadovnick, A.D.; Ebers, G.C. Twin Concordance and Sibling Recurrence Rates in Multiple Sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 12877–12882, doi:10.1073/pnas.1932604100.
58. Np, R.; M, F.; J, D.; D, C.; N, W.; Da, C. Age-Adjusted Recurrence Risks for Relatives of Patients with Multiple Sclerosis. *Brain J. Neurol.* **1996**, *119* (Pt 2), doi:10.1093/brain/119.2.449.
59. Horton, R.; Wilming, L.; Rand, V.; Lovering, R.C.; Bruford, E.A.; Khodiyar, V.K.; Lush, M.J.; Povey, S.; Talbot, C.C.; Wright, M.W.; et al. Gene Map of the Extended Human MHC. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 889–899, doi:10.1038/nrg1489.
60. Shiina, T.; Hosomichi, K.; Inoko, H.; Kulski, J.K. The HLA Genomic Loci Map: Expression, Interaction, Diversity and Disease. *J. Hum. Genet.* **2009**, *54*, 15–39, doi:10.1038/jhg.2008.5.
61. Naito, S.; Namerow, N.; Mickey, M.R.; Terasaki, P.I. Multiple Sclerosis: Association with HL-A3. *Tissue Antigens* **1972**, *2*, 1–4, doi:10.1111/j.1399-0039.1972.tb00111.x.
62. Jersild, C.; Svejgaard, A.; Fog, T. HL-A Antigens and Multiple Sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* **1972**, *1*, 1240–1241, doi:10.1016/S0140-6736(72)90962-2.

63. Hollenbach, J.A.; Pando, M.J.; Caillier, S.J.; Gourraud, P.-A.; Oksenberg, J.R. The Killer Immunoglobulin-like Receptor KIR3DL1 Combination with HLA-Bw4 Is Protective against Multiple Sclerosis in African Americans. *Genes Immun.* **2016**, *17*, 199–202, doi:10.1038/gene.2016.5.
64. Fusco, C.; Andreone, V.; Coppola, G.; Luongo, V.; Guerini, F.; Pace, E.; Florio, C.; Pirozzi, G.; Lanzillo, R.; Ferrante, P.; et al. HLA-DRB1*1501 and Response to Copolymer-1 Therapy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Neurology* **2001**, *57*, 1976–1979, doi:10.1212/wnl.57.11.1976.
65. Moutsianas, L.; Jostins, L.; Beecham, A.H.; Dilthey, A.T.; Xifara, D.K.; Ban, M.; Shah, T.S.; Patsopoulos, N.A.; Alfredsson, L.; Anderson, C.A.; et al. Class II HLA Interactions Modulate Genetic Risk for Multiple Sclerosis. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1107–1113, doi:10.1038/ng.3395.
66. Holick, M.F. Vitamin D Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 266–281, doi:10.1056/NEJMra070553.
67. Holick, M.F. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. *Mayo Clin. Proc.* **2006**, *81*, 353–373, doi:10.4065/81.3.353.
68. Bikle, D.D. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 319–329, doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.016.
69. Hsu, F.; Kent, W.J.; Clawson, H.; Kuhn, R.M.; Diekhans, M.; Haussler, D. The UCSC Known Genes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2006**, *22*, 1036–1046, doi:10.1093/bioinformatics/btl048.
70. Mf, H.; Nc, B.; Ha, B.-F.; Cm, G.; Da, H.; Rp, H.; Mh, M.; Cm, W. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, doi:10.1210/jc.2011-0385.
71. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*; Ross, A.C., Taylor, C.L., Yaktine, A.L., Del Valle, H.B., Eds.; The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health; National Academies Press (US): Washington (DC), 2011;
72. J, S.; J, D.; P, M.; R, H. Vitamin D as an Immune Modulator in Multiple Sclerosis, a Review. *J. Neuroimmunol.* **2008**, *194*, doi:10.1016/j.jneuroim.2007.11.014.
73. Smolders, J.; Peelen, E.; Thewissen, M.; Menheere, P.; Tervaert, J.W.C.; Hupperts, R.; Damoiseaux, J. The Relevance of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms for Vitamin D Research in Multiple Sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **2009**, *8*, 621–626, doi:10.1016/j.autrev.2009.02.009.
74. Pike, J.W.; Meyer, M.B. The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D(3). *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2010**, *39*, 255–269, table of contents, doi:10.1016/j.ecl.2010.02.007.
75. Kampman, M.T.; Brustad, M. Vitamin D: A Candidate for the Environmental Effect in Multiple Sclerosis - Observations from Norway. *Neuroepidemiology* **2008**, *30*, 140–146, doi:10.1159/000122330.
76. Patsopoulos, N.A. Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a028951, doi:10.1101/cshperspect.a028951.
77. Baer, R.; Bankier, A.T.; Biggin, M.D.; Deininger, P.L.; Farrell, P.J.; Gibson, T.J.; Hatfull, G.; Hudson, G.S.; Satchwell, S.C.; Séguin, C. DNA Sequence and Expression of the B95-8 Epstein-Barr Virus Genome. *Nature* **1984**, *310*, 207–211, doi:10.1038/310207a0.
78. Da, T.-L. EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2015**, *390*, doi:10.1007/978-3-319-22822-8_8.
79. B, C.; L, H.-F. Gammaherpesviruses Entry and Early Events during Infection Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21348095/> (accessed on 13 October 2024).
80. Speck, P.; Haan, K.M.; Longnecker, R. Epstein-Barr Virus Entry into Cells. *Virology* **2000**, *277*, 1–5, doi:10.1006/viro.2000.0624.
81. Soldan, S.S.; Lieberman, P.M. Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 51–64, doi:10.1038/s41579-022-00770-5.
82. Mandato, C.; Colucci, A.; Lanzillo, R.; Staiano, A.; Scarpato, E.; Schiavo, L.; Operto, F.F.; Serra, M.R.; Di Monaco, C.; Napoli, J.S.; et al. Multiple Sclerosis—Related Dietary and Nutritional Issues: An Updated Scoping Review with a Focus on Pediatrics. *Children* **2023**, *10*, 1022, doi:10.3390/children10061022.
83. Sanchez, J.M.S.; DePaula-Silva, A.B.; Libbey, J.E.; Fujinami, R.S. Role of Diet in Regulating the Gut Microbiota and Multiple Sclerosis. *Clin. Immunol.* **2022**, *235*, 108379, doi:10.1016/j.clim.2020.108379.

84. Li, X.; Alu, A.; Wei, Y.; Wei, X.; Luo, M. The Modulatory Effect of High Salt on Immune Cells and Related Diseases. *Cell Prolif.* **2022**, *55*, e13250, doi:10.1111/cpr.13250.
85. Yu, H.; Bai, S.; Hao, Y.; Guan, Y. Fatty Acids Role in Multiple Sclerosis as “Metabokines.” *J. Neuroinflammation* **2022**, *19*, 157, doi:10.1186/s12974-022-02502-1.
86. Daryabor, G.; Amirghofran, Z.; Gholijani, N.; Bemani, P. Obesity and Adipose Tissue-Derived Cytokines in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Endocr. Metab. Immune Disord. - Drug Targets* **22**, 1217–1231, doi:10.2174/1871530322666220215110041.
87. Fanara, S.; Aprile, M.; Iacono, S.; Schirò, G.; Bianchi, A.; Brighina, F.; Dominguez, L.J.; Ragonese, P.; Salemi, G. The Role of Nutritional Lifestyle and Physical Activity in Multiple Sclerosis Pathogenesis and Management: A Narrative Review. *Nutrients* **2021**, *13*, 3774, doi:10.3390/nu13113774.
88. Wingerchuk, D.M. Smoking: Effects on Multiple Sclerosis Susceptibility and Disease Progression. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2012**, *5*, 13–22, doi:10.1177/1756285611425694.
89. Mohammadi, M.J.; Zarea, K.; Hatamzadeh, N.; Salahshouri, A.; Sharhani, A. Toxic Air Pollutants and Their Effect on Multiple Sclerosis: A Review Study. *Front. Public Health* **2022**, *10*, 898043, doi:10.3389/fpubh.2022.898043.
90. Hartline, D.K.; Colman, D.R. Rapid Conduction and the Evolution of Giant Axons and Myelinated Fibers. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, R29–R35, doi:10.1016/j.cub.2006.11.042.
91. Ford, M.C.; Alexandrova, O.; Cossell, L.; Stange-Marten, A.; Sinclair, J.; Kopp-Scheinpflug, C.; Pecka, M.; Attwell, D.; Grothe, B. Tuning of Ranvier Node and Internode Properties in Myelinated Axons to Adjust Action Potential Timing. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8073, doi:10.1038/ncomms9073.
92. Griffiths, I.; Klugmann, M.; Anderson, T.; Yool, D.; Thomson, C.; Schwab, M.H.; Schneider, A.; Zimmermann, F.; McCulloch, M.; Nadon, N.; et al. Axonal Swellings and Degeneration in Mice Lacking the Major Proteolipid of Myelin. *Science* **1998**, *280*, 1610–1613, doi:10.1126/science.280.5369.1610.
93. Simkins, T.J.; Duncan, G.J.; Bourdette, D. Chronic Demyelination and Axonal Degeneration in Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Therapeutic Implications. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2021**, *21*, 26, doi:10.1007/s11910-021-01110-5.
94. Hemmer, B.; Kerschensteiner, M.; Korn, T. Role of the Innate and Adaptive Immune Responses in the Course of Multiple Sclerosis. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 406–419, doi:10.1016/S1474-4422(14)70305-9.
95. Traugott, U. Characterization and Distribution of Lymphocyte Subpopulations in Multiple Sclerosis Plaques versus Autoimmune Demyelinating Lesions. *Springer Semin. Immunopathol.* **1985**, *8*, 71–95, doi:10.1007/BF00197248.
96. Tada, T.; Takemori, T.; Okumura, K.; Nonaka, M.; Tokuhisa, T. Two Distinct Types of Helper T Cells Involved in the Secondary Antibody Response: Independent and Synergistic Effects OF Ia⁺ and Ia⁺ Helper T Cells*. *J. Exp. Med.* **1978**, *147*, 446–458, doi:10.1084/jem.147.2.446.
97. Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T.B.; Oukka, M.; Weiner, H.L.; Kuchroo, V.K. Reciprocal Developmental Pathways for the Generation of Pathogenic Effector TH17 and Regulatory T Cells. *Nature* **2006**, *441*, 235–238, doi:10.1038/nature04753.
98. Jacobsen, M.; Cepok, S.; Quak, E.; Happel, M.; Gaber, R.; Ziegler, A.; Schock, S.; Oertel, W.H.; Sommer, N.; Hemmer, B. Oligoclonal Expansion of Memory CD8⁺ T Cells in Cerebrospinal Fluid from Multiple Sclerosis Patients. *Brain* **2002**, *125*, 538–550, doi:10.1093/brain/awf059.
99. Barry, M.; Bleackley, R.C. Cytotoxic T Lymphocytes: All Roads Lead to Death. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 401–409, doi:10.1038/nri819.
100. Baecher-Allan, C.; Kaskow, B.J.; Weiner, H.L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* **2018**, *97*, 742–768, doi:10.1016/j.neuron.2018.01.021.
101. Comi, G.; Bar-Or, A.; Lassmann, H.; Uccelli, A.; Hartung, H.-P.; Montalban, X.; Sørensen, P.S.; Hohlfeld, R.; Hauser, S.L.; Expert Panel of the 27th Annual Meeting of the European Charcot Foundation Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann. Neurol.* **2021**, *89*, 13–23, doi:10.1002/ana.25927.
102. Samuel F. Hunter, M.D. Overview and Diagnosis of Multiple Sclerosis. **2016**, 22.
103. Travers, B.S.; Tsang, B.K.-T.; Barton, J.L. Multiple Sclerosis: Diagnosis, Disease-Modifying Therapy and Prognosis. *Aust. J. Gen. Pract.* **2022**, *51*, 199–206, doi:10.31128/AJGP-07-21-6103.

104. Klineova, S.; Lublin, F.D. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a028928, doi:10.1101/cshperspect.a028928.
105. Hartung, H.-P.; Graf, J.; Aktas, O.; Mares, J.; Barnett, M.H. Diagnosis of Multiple Sclerosis: Revisions of the McDonald Criteria 2017 - Continuity and Change. *Curr. Opin. Neurol.* **2019**, *32*, 327–337, doi:10.1097/WCO.0000000000000699.
106. Brownlee, W.J.; Hardy, T.A.; Fazekas, F.; Miller, D.H. Diagnosis of Multiple Sclerosis: Progress and Challenges. *Lancet Lond. Engl.* **2017**, *389*, 1336–1346, doi:10.1016/S0140-6736(16)30959-X.
107. Manjunatha, R.T.; Habib, S.; Sangaraju, S.L.; Yepez, D.; Grandes, X.A. Multiple Sclerosis: Therapeutic Strategies on the Horizon. *Cureus* **2022**, *14*, e24895, doi:10.7759/cureus.24895.
108. Hauser, S.L.; Cree, B.A. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am. J. Med.* **2020**, *133*, 1380, doi:10.1016/j.amjmed.2020.05.049.
109. Perosa, F.; Favoino, E.; Caragnano, M.A.; Prete, M.; Dammacco, F. CD20: A Target Antigen for Immunotherapy of Autoimmune Diseases. *Autoimmun. Rev.* **2005**, *4*, 526–531, doi:10.1016/j.autrev.2005.04.004.
110. Lamb, Y.N. Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *Drugs* **2022**, *82*, 323–334, doi:10.1007/s40265-022-01672-9.
111. Sellebjerg, F.; Blinkenberg, M.; Sorensen, P.S. Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for Relapsing and Progressive Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **2020**, *34*, 269–280, doi:10.1007/s40263-020-00704-w.
112. Greenfield, A.L.; Hauser, S.L. B-Cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an Era. *Ann. Neurol.* **2018**, *83*, 13–26, doi:10.1002/ana.25119.
113. Gibiansky, E.; Petry, C.; Mercier, F.; Günther, A.; Herman, A.; Kappos, L.; Hauser, S.; Yamamoto, Y.; Wang, Q.; Model, F.; et al. Ocrelizumab in Relapsing and Primary Progressive Multiple Sclerosis: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analyses of OPERA I, OPERA II and ORATORIO. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2021**, *87*, 2511–2520, doi:10.1111/bcp.14658.
114. Hauser, S.L.; Bar-Or, A.; Comi, G.; Giovannoni, G.; Hartung, H.-P.; Hemmer, B.; Lublin, F.; Montalban, X.; Rammohan, K.W.; Selmaj, K.; et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 221–234, doi:10.1056/NEJMoa1601277.
115. Montalban, X.; Hauser, S.L.; Kappos, L.; Arnold, D.L.; Bar-Or, A.; Comi, G.; de Seze, J.; Giovannoni, G.; Hartung, H.-P.; Hemmer, B.; et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 209–220, doi:10.1056/NEJMoa1606468.
116. Bar-Or, A.; O'Brien, S.M.; Sweeney, M.L.; Fox, E.J.; Cohen, J.A. Clinical Perspectives on the Molecular and Pharmacological Attributes of Anti-CD20 Therapies for Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **2021**, *35*, 985–997, doi:10.1007/s40263-021-00843-8.
117. Ribatti, D.; Tamma, R.; Annese, T. Mast Cells and Angiogenesis in Multiple Sclerosis. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* **2020**, *69*, 1103–1110, doi:10.1007/s00011-020-01394-2.
118. Proescholdt, M.A.; Jacobson, S.; Tresser, N.; Oldfield, E.H.; Merrill, M.J. Vascular Endothelial Growth Factor Is Expressed in Multiple Sclerosis Plaques and Can Induce Inflammatory Lesions in Experimental Allergic Encephalomyelitis Rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2002**, *61*, 914–925, doi:10.1093/jnen/61.10.914.
119. Girolamo, F.; Coppola, C.; Ribatti, D.; Trojano, M. Angiogenesis in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Acta Neuropathol. Commun.* **2014**, *2*, 84, doi:10.1186/s40478-014-0084-z.
120. Protein Kinase C - Homo Sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt Available online: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/B4DFV1/entry> (accessed on 6 November 2024).
121. Nishizuka, Y. Studies and Perspectives of Protein Kinase C. *Science* **1986**, *233*, 305–312, doi:10.1126/science.3014651.
122. Friedrich, B.; Gullberg, M. The Role of Protein Kinase C in Early Activation vs. Growth of T Lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **1988**, *18*, 489–492, doi:10.1002/eji.1830180327.
123. Goldberg, M.A.; Dunning, S.P.; Bunn, H.F. Regulation of the Erythropoietin Gene: Evidence That the Oxygen Sensor Is a Heme Protein. *Science* **1988**, *242*, 1412–1415, doi:10.1126/science.2849206.

124. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 Is a Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O₂ Tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5510–5514, doi:10.1073/pnas.92.12.5510.
125. Ke, Q.; Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1469–1480, doi:10.1124/mol.106.027029.
126. Pugh, C.W.; O'Rourke, J.F.; Nagao, M.; Gleadle, J.M.; Ratcliffe, P.J. Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1; Definition of Regulatory Domains within the Alpha Subunit. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11205–11214, doi:10.1074/jbc.272.17.11205.
127. Lando, D.; Peet, D.J.; Gorman, J.J.; Whelan, D.A.; Whitelaw, M.L.; Bruick, R.K. FIH-1 Is an Asparaginyl Hydroxylase Enzyme That Regulates the Transcriptional Activity of Hypoxia-Inducible Factor. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 1466–1471, doi:10.1101/gad.991402.
128. Rosen, L.S. Clinical Experience with Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* **2002**, *9*, 36–44, doi:10.1177/107327480200902505.
129. Melincovici, C.S.; Boşca, A.B.; Şuşman, S.; Mărginean, M.; Mişu, C.; Istrate, M.; Moldovan, I.M.; Roman, A.L.; Mişu, C.M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - Key Factor in Normal and Pathological Angiogenesis. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **2018**, *59*, 455–467.
130. Amadio, M.; Govoni, S.; Pascale, A. Targeting VEGF in Eye Neovascularization: What's New?: A Comprehensive Review on Current Therapies and Oligonucleotide-Based Interventions under Development. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 253–269, doi:10.1016/j.phrs.2015.11.027.
131. Stevens, M.; Oltean, S. Modulation of VEGF-A Alternative Splicing as a Novel Treatment in Chronic Kidney Disease. *Genes* **2018**, *9*, 98, doi:10.3390/genes9020098.
132. Peach, C.J.; Mignone, V.W.; Arruda, M.A.; Alcobia, D.C.; Hill, S.J.; Kilpatrick, L.E.; Woolard, J. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1264, doi:10.3390/ijms19041264.
133. Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 337–349, doi:10.1016/s0891-5849(02)00905-x.
134. Chen, J.; Cascio, J.; Magee, J.D.; Techasintana, P.; Gubin, M.M.; Dahm, G.M.; Calaluze, R.; Yu, S.; Atasoy, U. Posttranscriptional Gene Regulation of IL-17 by the RNA-Binding Protein HuR Is Required for Initiation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2013**, *191*, 5441–5450, doi:10.4049/jimmunol.1301188.
135. Borgonetti, V.; Sanna, M.D.; Lucarini, L.; Galeotti, N. Targeting the RNA-Binding Protein HuR Alleviates Neuroinflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Potential Therapy for Multiple Sclerosis. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2021**, *18*, 412–429, doi:10.1007/s13311-020-00958-8.
136. Borgonetti, V.; Galeotti, N. Posttranscriptional Regulation of Gene Expression Participates in the Myelin Restoration in Mouse Models of Multiple Sclerosis: Antisense Modulation of HuR and HuD ELAV RNA Binding Protein. *Mol. Neurobiol.* **2023**, *60*, 2661–2677, doi:10.1007/s12035-023-03236-8.
137. Pistono, C.; Monti, M.C.; Marchesi, N.; Boiocchi, C.; Campagnoli, L.I.M.; Morlotti, D.; Cuccia, M.; Govoni, S.; Montomoli, C.; Mallucci, G.; et al. Unraveling a New Player in Multiple Sclerosis Pathogenesis: The RNA-Binding Protein HuR. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, *41*, 102048, doi:10.1016/j.msard.2020.102048.
138. Dai, W.; Zhang, G.; Makeyev, E.V. RNA-Binding Protein HuR Autoregulates Its Expression by Promoting Alternative Polyadenylation Site Usage. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 787–800, doi:10.1093/nar/gkr783.
139. Pullmann, R.; Kim, H.H.; Abdelmohsen, K.; Lal, A.; Martindale, J.L.; Yang, X.; Gorospe, M. Analysis of Turnover and Translation Regulatory RNA-Binding Protein Expression through Binding to Cognate mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 6265–6278, doi:10.1128/MCB.00500-07.

140. Pascale, A.; Govoni, S. The Complex World of Post-Transcriptional Mechanisms: Is Their Dereglulation a Common Link for Diseases? Focus on ELAV-like RNA-Binding Proteins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2012**, *69*, 501–517, doi:10.1007/s00018-011-0810-7.
141. Lal, P.; Cerofolini, L.; D'Agostino, V.G.; Zucal, C.; Fuccio, C.; Bonomo, I.; Dassi, E.; Giuntini, S.; Di Maio, D.; Vishwakarma, V.; et al. Regulation of HuR Structure and Function by Dihydrotanshinone-I. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 9514–9527, doi:10.1093/nar/gkx623.
142. Grammatikakis, I.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. Posttranslational Control of HuR Function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2017**, *8*, doi:10.1002/wrna.1372.
143. Joseph, B.; Orlian, M.; Furneaux, H. P21(Waf1) mRNA Contains a Conserved Element in Its 3'-Untranslated Region That Is Bound by the Elav-like mRNA-Stabilizing Proteins. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20511–20516, doi:10.1074/jbc.273.32.20511.
144. Kregel, K.C. Heat Shock Proteins: Modifying Factors in Physiological Stress Responses and Acquired Thermotolerance. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **2002**, *92*, 2177–2186, doi:10.1152/jappphysiol.01267.2001.
145. Milner, C.M.; Campbell, R.D. Structure and Expression of the Three MHC-Linked HSP70 Genes. *Immunogenetics* **1990**, *32*, 242–251, doi:10.1007/BF00187095.
146. Chirico, W.J.; Waters, M.G.; Blobel, G. 70K Heat Shock Related Proteins Stimulate Protein Translocation into Microsomes. *Nature* **1988**, *332*, 805–810, doi:10.1038/332805a0.
147. Deshaies, R.J.; Koch, B.D.; Werner-Washburne, M.; Craig, E.A.; Schekman, R. A Subfamily of Stress Proteins Facilitates Translocation of Secretory and Mitochondrial Precursor Polypeptides. *Nature* **1988**, *332*, 800–805, doi:10.1038/332800a0.
148. Bertelsen, E.B.; Chang, L.; Gestwicki, J.E.; Zuiderweg, E.R.P. Solution Conformation of Wild-Type E. Coli Hsp70 (DnaK) Chaperone Complexed with ADP and Substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 8471–8476, doi:10.1073/pnas.0903503106.
149. Turturici, G.; Sconzo, G.; Geraci, F. Hsp70 and Its Molecular Role in Nervous System Diseases. *Biochem. Res. Int.* **2011**, *2011*, 618127, doi:10.1155/2011/618127.
150. Rosenzweig, R.; Nillegoda, N.B.; Mayer, M.P.; Bukau, B. The Hsp70 Chaperone Network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 665–680, doi:10.1038/s41580-019-0133-3.
151. D'Souza, S.D.; Antel, J.P.; Freedman, M.S. Cytokine Induction of Heat Shock Protein Expression in Human Oligodendrocytes: An Interleukin-1-Mediated Mechanism. *J. Neuroimmunol.* **1994**, *50*, 17–24, doi:10.1016/0165-5728(94)90210-0.
152. Mansilla, M.J.; Montalban, X.; Espejo, C. Heat Shock Protein 70: Roles in Multiple Sclerosis. *Mol. Med. Camb. Mass* **2012**, *18*, 1018–1028, doi:10.2119/molmed.2012.00119.
153. Boiocchi, C.; Osera, C.; Monti, M.C.; Ferraro, O.E.; Govoni, S.; Cuccia, M.; Montomoli, C.; Pascale, A.; Bergamaschi, R. Are Hsp70 Protein Expression and Genetic Polymorphism Implicated in Multiple Sclerosis Inflammation? *J. Neuroimmunol.* **2014**, *268*, 84–88, doi:10.1016/j.jneuroim.2014.01.004.
154. Heneka, M.T.; Sharp, A.; Murphy, P.; Lyons, J.-A.; Dumitrescu, L.; Feinstein, D.L. The Heat Shock Response Reduces Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 568–579, doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00260.x.
155. Bonetta Valentino, R. The Structure-Function Relationships and Physiological Roles of MnSOD Mutants. *Biosci. Rep.* **2022**, *42*, BSR20220202, doi:10.1042/BSR20220202.
156. Bhaskaran, S.; Kumar, G.; Thadathil, N.; Piekarz, K.M.; Mohammed, S.; Lopez, S.D.; Qaisar, R.; Walton, D.; Brown, J.L.; Murphy, A.; et al. Neuronal Deletion of MnSOD in Mice Leads to Demyelination, Inflammation and Progressive Paralysis That Mimics Phenotypes Associated with Progressive Multiple Sclerosis. *Redox Biol.* **2023**, *59*, 102550, doi:10.1016/j.redox.2022.102550.

