

VALUTAZIONE DI MARKERS NEUROPATOLOGICI ASSOCIATI ALLE MALATTIE DI PARKINSON E ALZHEIMER NEL MODELLO DI TOPO C-REL^{-/-}

INTRODUZIONE

I fattori NF-kappaB sono una famiglia di fattori trascrizionali ampiamente rappresentata all'interno del Sistema Nervoso Centrale dove svolgono sia un'importante funzione di regolazione dei processi di differenziamento, plasticità e trasmissione sinaptica che nella patogenesi di processi neurodegenerativi associati all'ischemia cerebrale e al trauma e alle Malattie di Parkinson e di Alzheimer (Pizzi & Spano, 2006). Negli ultimi anni il nostro laboratorio ha dimostrato che la variabilità della risposta cellulare all'attivazione dei fattori NF-kappaB nei processi neurodegenerativi può risiedere in una differenziale partecipazione delle diverse subunità NF-kappaB a formare il dimero attivo in risposta a stimoli esterni. Queste subunità appartengono ad una superfamiglia che comprende almeno cinque proteine leganti il DNA: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel e RelB. La forma inducibile di NF-kappaB è localizzata a livello citoplasmatico dove si trova associata a una proteina inibitoria IKappaB, che, in risposta a stimoli extracellulari, viene fosforilata e si dissocia dal dimero consentendo in tal modo la traslocazione di quest'ultimo verso il nucleo. La formazione di differenti dimeri NF-kappaB è responsabile di effetti opposti sulla sopravvivenza neuronale. È stato dimostrato che il dimero p50/p65 è coinvolto nella neurotossicità causata da glutammato o da beta amiloide, mentre i dimeri composti da c-Rel mediano gli effetti neuroprotettivi indotti da IL-1beta e dagli agonisti del recettore metabotropico di tipo 5 (mGluR5) (Pizzi et al., 2002, 2005). Lo studio sull'invecchiamento cerebrale in un modello animale che porta la delezione del gene c-rel iniziato negli ultimi anni ci ha permesso di studiare il possibile coinvolgimento della proteina c-Rel nella patogenesi delle forme sporadiche di Parkinson e di Alzheimer. I topi c-rel^{-/-} mostrano uno sviluppo cerebrale apparentemente normale e conservano una buona condizione di salute nel corso della loro vita. Tuttavia, a partire dal terzo mese di età i

topi mostrano deficit a livello della memoria spaziale (Levenson et al., 2004) correlati ad alterazioni della plasticità sinaptica. In particolare, i deficit riguardano la riduzione sia del processo di potenziamento (Ahn et al., 2008) che di depressione a lungo termine dell'attività sinaptica nell'ippocampo (O'Riordan et al., 2006), meccanismi coinvolti nei processi di immagazzinamento a lungo termine delle informazioni.

La nostra ipotesi di lavoro è che la proteina c-Rel possa rappresentare un target molecolare all'interno delle malattie neurologiche associate a perdita di cellule neuronali e che i cambiamenti nell'espressione di c-Rel possano portare a una vulnerabilità neuronale con l'invecchiamento. Il presente studio dimostra che durante l'invecchiamento i topi $c-rel^{-/-}$ presentano una perdita significativa dei neuroni dopaminergici della substantia nigra, associata ad accumulo di marcatori proteici di neurodegenerazione quali alpha-sinucleina insolubile e proteina Tau iperfosforilata.

Risultati

Insieme alla degenerazione dei neuroni dopaminergici della substantia nigra, i topi *c-rel*^{-/-} esprimono un marcato aumento dell'immunoreattività per l'alpha-sinucleina, il maggiore componente delle inclusioni filamentose dei corpi di Lewy e dei neuriti di Lewy, marker patologici della Malattia di Parkinson. Il lavoro svolto presso il Centre for Brain Repair dell'Università di Cambridge ha permesso di evidenziare la localizzazione dell'alpha-sinucleina all'interno dei neuroni dopaminergici della sostanza nera dei topi *c-rel*^{-/-} di 18 mesi utilizzando saggi di doppia immunostochimica in brown-staining e saggi di western blotting. I saggi di immunostochimica in brown-staining sono stati realizzati utilizzando gli anticorpi primari TH e SYN-1 immunoreattivi rispettivamente per i neuroni dopaminergici e per gli aggregati di alpha-sinucleina con sistema di rivelazione avidina-biotina e utilizzando come cromogeni la 3,3-diaminobenzidina (DAB) per rivelare la reattività di SYN-1 e il VECTOR SG Substrate per la rivelare la reattività di TH. Con l'utilizzo di tale metodica è stato osservato un aumento della reattività per la proteina alpha-sinucleina che si accumula a formare inclusioni cellulari nei neuroni positivi per l'enzima TH nella substantia nigra dei topi *c-rel*^{-/-} di 18 mesi. L'implicazione del marker alpha-sinucleina nella neurodegenerazione associata a Malattia di Parkinson è stata confermata attraverso analisi di Western blotting effettuate su gel di poliacrilamide al 12% e caricando 5µg di estratti proteici ottenuti eseguendo un'estrazione specifica per isolare la componente solubile e quella insolubile della proteina alpha-sinucleina. Il protocollo di estrazione proteica prevede l'utilizzo dei seguenti buffers: TBS⁺ (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 175 mM, EDTA 5 mM pH 7.4, PMSF 0.1 mM e N-Etylmaleimide 1 mM); TBS+/Triton 1%; RIPA/SDS 0.5% e UREA 8M/SDS5%. I primi tre buffer permettono di rivelare l'accumulo di alpha-sinucleina solubile presente nel campione mentre l'ultimo buffer permette di individuare la presenza di alpha-sinucleina insolubile. Come è possibile vedere dalla figura 2 si può notare che la presenza di alpha-sinucleina non evidenzia differenze tra i

topi wt e i topi $c\text{-rel}^{-/-}$ di 18 mesi a livello della corteccia, dello striato e dell'ippocampo mentre è presente un maggiore accumulo di alpha-sinucleina solubile a livello del mesencefalo. Tale accumulo è stato quantificato mediante analisi densitometrica delle bande. La successiva analisi statistica ha evidenziato un aumento significativo nei topi $c\text{-rel}^{-/-}$ di 18 mesi rispetto ai topi wt della stessa età come mostrato nel grafico della figura 3. A questo punto si è deciso di studiare in maniera più approfondita all'interno del mesencefalo per cercare di capire se l'accumulo di alpha-sinucleina potesse essere motivato anche dalla presenza di alpha-sinucleina insolubile. La componente insolubile dell'alpha-sinucleina è infatti di particolare importanza in quanto il suo accumulo determina la formazione dei corpi di Lewy, inclusioni cellulari che rappresentano un marker patologico delle malattie neurodegenerative come la Malattia di Parkinson e della demenza associata alla Malattia di Alzheimer. Allo scopo di evidenziare la presenza di alpha-sinucleina insolubile nei nostri estratti è stato ripetuto il saggio di western blotting caricando nel gel una concentrazione proteica maggiore (20 μg) di estratti proteici del mesencefalo. In effetti, come si può vedere dalla figura 2 si nota la presenza di alpha-sinucleina insolubile nel topo $c\text{-rel}^{-/-}$ di 18 mesi rispetto all'animale wt della stessa età.

Inoltre, recenti studi eseguiti in collaborazione con l'Università di Cagliari hanno evidenziato che il topo $c\text{-rel}^{-/-}$ di 18 mesi mostra un deficit di resistenza allo sforzo nei test comportamentali rotarod e inverted grid. Questi dati preliminari hanno suggerito la possibilità di un possibile deficit a livello motoneuronale. Sulla base dei dati in letteratura che indicano la presenza di aggregati di alpha-sinucleina nel midollo spinale di soggetti affetti da malattia di Parkinson (Braak et al., 2007) è stato analizzato il contenuto di alpha-sinucleina solubile nei topi a livello del midollo spinale. Le analisi di western blotting non hanno evidenziato alcuna differenza nei livelli della proteina alpha-sinucleina nei topi $c\text{-rel}^{-/-}$ di 18 mesi e nei topi wt della stessa età (figura 4 e 5).

Una seconda parte del lavoro svolto ha riguardato lo studio dell'accumulo della proteina Tau iperfosforilata, proteina caratteristica dei grovigli neuro fibrillari e presenti nei cervelli dei soggetti affetti da diverse taupatie fra cui la principale, la malattia di Alzheimer. Dati precedenti avevano evidenziato un aumento dell'immunoreattività per Tau iperfosforilata, sia nell'ippocampo che nella corteccia associativa parietale dei topi *c-rel*^{-/-} di 18 mesi. Questi esperimenti erano stati condotti utilizzando l'anticorpo PHF-1 specifico per la proteina fosforilata in posizione Ser 396/ Ser 404. Per confermare l'accumulo della proteina Tau sono stati eseguiti saggi di western blotting su estratti citoplasmatici (EC) di topi *c-rel*^{-/-} e wt a 18 mesi. I risultati evidenziano un aumento di proteina Tau iperfosforilata nell'ippocampo dei topi *c-rel*^{-/-} confermando i dati precedentemente ottenuti. Ho valutato inoltre la possibilità che la proteina Tau accumulata nei cervelli di topo *c-rel*^{-/-} fosse fosforilata su altri residui, quali Ser 202/Thr 205, riconosciuti dall'anticorpo AT8, e Thr 231/Ser 235 riconosciuti dall'anticorpo AT180. Sono stati utilizzati a tale scopo dei saggi di immunostochimica con sistema di rivelazione avidina-biotina e utilizzando come cromogeno la 3,3-diaminobenzidina (DAB). I tessuti sono stati incubati con gli anticorpi primari O/N a 4°C e successivamente sono stati incubati con anticorpi secondari per 1 ora a temperatura ambiente. Il tessuto è stato marcato con il complesso avidina-biotina (Vector Laboratories) e incubato con il mouse-on-mouse kit (Vector Laboratories) per ridurre il background. È stato infine utilizzato una colorazione istochimica cresyl-violetto per evidenziare i nuclei cellulari (Figure 6 e 7). A differenza di quanto rilevato con l'anticorpo PHF-1, non è stato evidenziato alcun aumento di immunoreattività per AT8 o AT180 nei topi *c-rel*^{-/-} rispetto ai controlli, sia nella corteccia che nell'ippocampo.

Nei saggi di western blotting l'analisi dei gel è stata effettuata utilizzando il software Image J (link web <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). L'analisi statistica dei dati è stata condotta comparando due gruppi con il test di Student a due code utilizzando il programma Prism Graph Pad 4.0. L'ipotesi nulla è

stata rigettata al valore di 0.05. I risultati ottenuti sono stati espressi come la media \pm l'errore standard associato alla media (S.E.M.).

Lo studio condotto ha messo in evidenza che il modello animale di topo *c-rel*^{-/-} mostra accanto a una perdita dei neuroni dopaminergici nigrali e relativi terminali striatali anche un accumulo di marker neuropatologici. Infatti, la proteina alpha-sinucleina è presente sia in forma solubile che insolubile all'interno dei neuroni dopaminergici mesencefalici e in forma solubile, ma senza differenze tra il topo *c-rel*^{-/-} e il topo wt, a livello del midollo spinale. Inoltre, gli studi condotti indicano che nel topo *c-rel*^{-/-} si ha un accumulo della proteina iperfosforilata Tau nella corteccia e nell'ippocampo.

Queste evidenze suggeriscono che la proteina c-Rel potrebbe agire come un regolatore della vulnerabilità neuronale nella substantia nigra pars compacta durante l'invecchiamento e, pertanto, potrebbe essere implicata nella patogenesi delle forme sporadiche di Malattia di Parkinson come nella Malattia di Parkinson associata a demenza.

Referenze

Ahn HJ, Hernandez CM, Levenson JM, Lubin FD, Liou HC, Sweatt JD. *Learn Mem.* 15(7):539-49 (2008).

Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K. *Acta Neuropathol.* 113(4):421-9. (2007).

Levenson JM, Choi S, Lee SY, Cao YA, Ahn HJ, Worley KC, Pizzi M, Liou HC, & Sweatt JD. *J Neurosci.* 24(16):3933-43 (2004).

O'Riordan KJ, Huang IC, Pizzi M., Spano P, Boroni F., Egli R., Desai P., Fitch O., Malone L., Ahn HJ, Liou HC, Sweatt JD, & Levenson JM. *J. Neurosci.* 26(18):4870-9 (2006).

Pizzi M, Spano P. *Eur J Pharmacol.* 545(1):22-8 (2006). Pizzi M, Pizzi M, Sarnico I, Boroni F, Benarese M, Steimberg N, Mazzoleni G, Dietz GP, Bähr M, Liou HC, Spano PF. *Cell Death Differ.* 12(7):761-72 (2005).

Pizzi M, Goffi F, Boroni F, Benarese M, Perkins SE, Liou HC, Spano P. *J Biol Chem.* 277(23):20717-23 (2002).