

PROGETTO DI RICERCA:

CROSS PATHWAYS DI NEURODEGENERAZIONE E DI NEUROINFIAMMAZIONE NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER PER LO SVILUPPO DI NUOVE STRATEGIE NEUROPROTETTIVE: DAL MODELLO MURINO ALLE HiPSCs.

Tutor: Prof. Patrizia Hrelia

Il termine "neurodegenerazione" si riferisce a un gruppo di patologie caratterizzate dalla lenta e progressiva perdita di neuroni nel sistema nervoso centrale (SNC), responsabili sia di alterazioni funzionali che di demenza. Le manifestazioni cliniche, causate da danni neuronali, sono generalmente alterazioni mnesiche, difficoltà motorie, disturbi cognitivi e comportamentali.¹ La degenerazione cerebrale che caratterizza le malattie neurodegenerative è associata a fattori ambientali e genetici, oltre che a molteplici eventi cellulari e molecolari, come l'aumento dello stress ossidativo, le risposte infiammatorie, la disregolazione del trafficking e la formazione di depositi e aggregati proteici.²

La malattia neurodegenerativa più comune è la malattia di Alzheimer (MA), caratterizzata dal progressivo declino delle capacità cognitive e mnesiche. La MA è associata alla presenza di grovigli neurofibrillari intracellulari dovuti all'iperfosforilazione della proteina tau (ptau), e alla formazione di depositi extracellulari di proteina β -amiloide ($A\beta$). La MA è una malattia eterogenea e multifattoriale, difficile da discriminare da altre forme di demenza, il suo lungo processo degenerativo inizia con uno stadio preclinico in cui $A\beta$ e ptau iniziano ad aggregarsi, ma le capacità cognitive sono preservate, seguito da neurodegenerazione e decadimento cognitivo lieve (MCI), che progredisce fino alla MA clinica.

Per quanto la proteina $A\beta$ e i grovigli da essa formati siano un marker patologico importante della malattia, sembra che l'insorgenza della malattia non possa essere imputata solo ad essi; difatti, tutte le terapie mirate alla riduzione dell' $A\beta$ cerebrale non hanno dato risultati soddisfacenti.

Un ruolo chiave sembra essere svolto anche dal processo neuroinfiammatorio e dalle cellule gliali coinvolte, come astrociti e microglia.^{3 4}

È possibile che l'alterazione delle cellule gliali e la loro interazione con le strutture sinaptiche possano portare ad alterazione e disfunzioni dei meccanismi neuronali. In condizioni fisiologiche le cellule gliali sono fondamentali per l'omeostasi sinaptica e per la neurotrasmissione; al contrario, nella MA la presenza di cellule gliali reattive è indice del coinvolgimento del processo infiammatorio, suggerendo un ruolo cruciale di queste cellule nello sviluppo e progressione della patologia.³

È stato suggerito che nel percorso patogenetico della MA il punto di non ritorno possa coincidere con il momento in cui le cellule gliali creano uno stato di infiammazione eccessivo che va ad associarsi all'accumulo di $A\beta$ e tau, portando ad un circolo vizioso in cui, stimolandosi a vicenda, si ha sinaptotossicità e neurodegenerazione.⁵ L'identificazione di

aumentati livelli di marker dell'inflammation in pazienti affetti da MA e la scoperta di geni, coinvolti nella risposta immunitaria, associati ad un aumentato rischio per lo sviluppo della patologia suggerisce un ruolo sempre più centrale della neuroinflammation nella patogenesi della MA.⁶ La gliosi, che spesso si riscontra nel cervello di pazienti affetti da MA, è generalmente considerata una conseguenza del deposito di A β e della neurodegenerazione, tuttavia recentemente nuovi studi suggeriscono un ruolo del processo infiammatorio nelle prime fasi del processo patologico.⁷

La stretta connessione tra microglia e astrociti con le sinapsi è stata indagata dal punto di vista funzionale, ispirando diverse ipotesi sui ruoli positivi o dannosi dei fattori immunitari nell'invecchiamento fisiologico e patologico.⁸ È quindi possibile che l'alterazione della relazione dinamica delle cellule gliali con le strutture e la funzione sinaptica contribuisca ad una disfunzione delle connessioni sinaptiche.

L'European Brain Council ha stimato che 1 europeo su 3 è affetto da almeno un disturbo cerebrale e che queste malattie costano circa 800 miliardi di euro/anno.⁹ I farmaci attualmente disponibili non sono in grado di rallentare il declino cognitivo e funzionale e, nonostante i numerosi progressi nello studio della MA, ad oggi le terapie d'elezione sono esclusivamente di tipo sintomatico e quindi inefficaci nel contrastare lo sviluppo e la progressione della malattia. Il principale ostacolo per una terapia efficace per la MA è la mancanza di conoscenza sui meccanismi alla base della disfunzione sinaptica e della perdita neuronale. Pertanto, è fondamentale studiare le basi molecolari della patogenesi dell'AD per identificare nuovi bersagli terapeutici.⁵ Nonostante i numerosi progressi nello studio della MA, ad oggi le terapie d'elezione sono esclusivamente di tipo sintomatico e quindi inefficaci nel contrastare lo sviluppo e la progressione della malattia.

Il presente progetto mira all'individuazione di nuovi bersagli terapeutici nella MA utili allo sviluppo di nuove potenziali strategie terapeutiche e/o neuroprotettive nei confronti di tale patologia. A questo scopo, lo studio si avvarrà di un approccio integrato di tecniche e modelli innovativi. L'obiettivo sarà quello di individuare i pathway cellulari e molecolari di neurodegenerazione coinvolti nel processo di neuroinflammation e di creare un modello *in vitro* di Human induced Pluripotent stem cells (HiPSCs) che riassuma le alterazioni patologiche associate all'inflammation cerebrale in un paziente affetto da MA, così da identificare i *cross-pathway* comuni ai meccanismi neuroprotettivi, e fornire strumenti fondamentali alla progettazione di nuove strategie farmacologiche.

Bibliografia

1. Solanki, I., Parihar, P. & Parihar, M. S. Neurodegenerative diseases: From available treatments to prospective herbal therapy. *Neurochem. Int.* 95, 100–108 (2016).
2. Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M. & Ghafourifar, P. Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1272–1284 (2008).
3. Salter, M. W. & Beggs, S. Sublime microglia: Expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158, 15–24 (2014).
4. Avila-Muñoz, E. & Arias, C. When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer’s disease. *Ageing Res. Rev.* 18, 29–40 (2014).
5. Labbadia, J. & Morimoto, R. I. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annual Review of Biochemistry* 84, 435–464 (2015).
6. Baierle, M., Nascimento, S., Moro, A. & Al., E. Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. *Oxid Med Cell Longev* 2015, (2015).
7. De Strooper, B. & Karran, E. The Cellular Phase of Alzheimer’s Disease. *Cell* 164, 603–615 (2016).
8. Salter, M. W. & Beggs, S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158, 15–24 (2014).
9. Di Luca, M. et al. Towards earlier diagnosis and treatment of disorders of the brain. *Bull. World Health Organ.* 96, 298 (2018).

PIANO DI ATTIVITA'

I anno

Nel primo anno del progetto il titolare dell'assegno dovrà impiegare un modello murino di MA precedentemente standardizzato (i.c.v. della forma oligomerica del peptide A β in topi C57BL/6). Gli animali verranno sottoposti ad analisi comportamentale, al fine di valutarne la compromissione cognitiva con specifici test. Dopo il sacrificio i campioni dei tessuti cerebrali saranno prelevati e l'assegnista utilizzerà le metodiche necessarie per la valutazione dei parametri di bilancio ossidativo, infiammatorio e di morte cellulare, nonché tecniche di Next Generation Sequencing per determinare i pathway compromessi ed alterati. I pathway verranno validati mediante tecniche di Western Blotting e immunoistochimiche. L'attenzione verrà posta verso i pathway coinvolti nel processo neuroinfiammatorio per identificare potenziali geni target che svolgono un ruolo chiave nella progressione della malattia.

II anno

Avvalendosi dei risultati ottenuti nel I anno e analizzando i dati presenti in letteratura ottenuti da genome-wide association study (GWAS), si selezioneranno dei geni le cui mutazioni sono associate ad un incremento del rischio di MA. L'obiettivo di questa fase sarà quello di creare un modello *in vitro* di Human induced Pluripotent stem cells (HiPSCs) che possa rappresentare alcuni degli aspetti biomolecolari che caratterizzano la MA, con particolare interesse verso la neuroinfiammazione. Le HiPSC stabilizzate verranno sottoposte a *genome-editing* per introdurre le mutazioni di interesse, in modo da poter studiare i pathway coinvolti. La generazione e la stabilizzazione della linea di HiPSC permetteranno di originare *in vitro* un modello per identificare e studiare potenziali target farmacologici per trattare questa patologia.

Il piano di formazione proposto vuole fornire competenze specifiche da acquisire presso i Laboratori di Tossicologia predittiva & Farmacogenomica del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie del nostro Ateneo, ad un laureato con il titolo di Dottore di Ricerca in Scienze Farmacologiche e affini.

In particolare, il piano di formazione descritto si fonda essenzialmente sull'apprendimento delle conoscenze e delle metodiche sperimentali necessarie per:

- quantificare proteine nucleari e citoplasmatiche in modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro*,
- l'analisi biomolecolare della condizione infiammatoria e ossidativa cellulare e tessutale, nonché dell'attivazione dei pathway biomolecolari associati alla neuroinfiammazione,
- la valutazione comportamentale, motoria e cognitiva dei modelli murini impiegati e loro sviluppo e mantenimento,
- l'analisi immunoistochimica in fluorescenza,
- generazione, coltura e mantenimento delle HiPSC,
- *genome editing* di linee cellulari.

Sulla base delle conoscenze acquisite, il destinatario dell'assegno dovrà poi impegnarsi a sviluppare ricerche atte a identificare potenziali target per interventi neuroprotettivi e valutare potenziali molecole bioattive capaci di interferire con i processi neuroinfiammatorio e ossidativo, responsabili della progressione della MA.