

PROGETTO DI RICERCA:

MECCANISMI NEURODEGENERATIVI NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER COME “CROSSTALK” NELLO SVILUPPO DI POTENZIALI STRATEGIE NEUROPROTETTIVE INNOVATIVE (Tutor: Prof.ssa Patrizia Hrelia)

Il presente progetto per l'assegno di ricerca è parte integrante del Progetto MIUR PRIN 2017 “Identification and validation of COmmon Pathways at the CrOssrOads of neurodegeneration and Neuroprotection (COCOON)” – 2017MYJ5TH_002 – Responsabile scientifico: Monica Maria Grazia Diluca – CUP J34I19001060005), Responsabile Unità Operativa Prof.ssa Patrizia Hrelia.

La malattia di Alzheimer (MA) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata dal progressivo declino delle capacità cognitive e mnesiche e rappresenta la forma più comune di demenza nella popolazione anziana. La MA è caratterizzata dalla presenza di grovigli neurofibrillari intracellulari dovuti all'iperfosforilazione della proteina tau, e dalla formazione di depositi extracellulari di proteina β -amiloide (A β) [1]. La forma più comune della malattia, quella sporadica, si manifesta generalmente in età avanzata, e la sua natura è prettamente multifattoriale [2]. Tra i fattori di rischio, l'invecchiamento ricopre un ruolo predominante, dato anche il progressivo aumento dell'aspettativa di vita e della componente anziana nella popolazione mondiale. L'invecchiamento è associato alla graduale diminuzione della proteostasi, ovvero del controllo del *turnover* proteico e della qualità delle proteine sintetizzate [3]. Tale meccanismo sottende tre processi principali: il *folding* proteico, la degradazione, e il trasporto delle proteine al sito d'azione [4]. A livello cellulare, il reticolo endoplasmatico (RE) è il principale sistema coinvolto nella sintesi proteica e appare drammaticamente compromesso nella MA. Infatti, nello sviluppo e nella progressione della patologia l'accumulo delle proteine A β e tau fosforilata sono probabilmente responsabili dell'aumento dello stress a carico del RE, che contribuisce alla disfunzione sinaptica e alla progressione del danno neurodegenerativo [5]. L'incremento del *misfolding* proteico a carico del RE determina una specifica risposta cellulare definita *unfolded protein response* (UPR) che a sua volta tenta prontamente di ristabilire il corretto network della proteostasi [6]. In questo contesto, il ruolo dell'UPR nella modulazione dello stress associato al RE potrebbe essere di grande interesse per lo sviluppo di strategie terapeutiche volte a contrastare o rallentare la MA.

Studi recenti hanno posto particolare attenzione sulla modulazione degli *small non-protein-coding RNA* (miRNA) e sulla relativa regolazione genica post-trascrizionale nella MA. I miRNA sono piccoli frammenti di RNA non codificanti coinvolti nel controllo dell'espressione genica post-trascrizionale e sono finemente coinvolti nella regolazione di molteplici processi cellulari, quali la proliferazione, la differenziazione, la migrazione, l'apoptosi e la senescenza [7]. Recentemente, è stato dimostrato che i miRNA possono essere regolati da condizioni di stress del RE e coinvolti in diversi processi cellulari tra cui l'apoptosi in seguito a stress del RE [8]. Ad ogni modo, il ruolo esatto dello stress del RE e dei miRNA nella patogenesi della MA rimane ancora irrisolto.

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 concetto di neuroprotezione definisce l'insieme degli approcci terapeutici capaci di influire positivamente sullo sviluppo della patologia, arrestandone o quantomeno rallentandone la sua progressione [10]. Per questa ragione, data la complessa natura multifattoriale delle patologie neurodegenerative in generale e della MA in particolare, un'efficace strategia neuroprotettiva dovrebbe essere incentrata su un approccio multitarget, quindi in grado di interagire simultaneamente nei confronti di molteplici fattori di rischio e meccanismi sottesi allo sviluppo della patologia nei primi stadi del suo sviluppo. In conclusione, un approccio sperimentale focalizzato sull'impiego di molecole bioattive multifunzionali, efficaci nel contrastare la propagazione del danno ossidativo e infiammatorio, e di contrastare la morte neuronale della MA e delle altre patologie neurodegenerative, può essere considerato promettente ai fini neuroprotettivi e neurorestorativi. Il presente progetto mira all'individuazione di nuovi bersagli terapeutici nella MA utili allo sviluppo di nuove potenziali strategie neuroprotettive nei confronti di tale patologia. A questo scopo, lo studio si avvarrà di un approccio integrato di tecniche e modelli già caratterizzati. L'obiettivo è quello di individuare i pathway cellulari e molecolari di neurodegenerazione nella MA, al fine di identificare i *cross-pathway* comuni ai meccanismi neuroprotettivi, fornendo quindi strumenti fondamentali alla progettazione di nuove strategie farmacologiche. In particolare, lo studio verterà sul ruolo dei miRNA, del RE e dell'UPR. A tal proposito, diverse questioni sono ad oggi ancora irrisolte: l'UPR ripristina la proteostasi e sostiene la funzionalità neuronale? L'UPR influenza la funzione sinaptica e la plasticità neuronale? L'UPR guida il processo neurodegenerativo? Lo stress del RE fa parte dell'eziologia della MA? Qual è il ruolo del pathway che coinvolge RE e miRNA nella patogenesi dell'AD? Qual è il ruolo dell'invecchiamento sulla funzionalità dell'UPR?

Nella prima fase del progetto sarà studiato il ruolo di UPR nella MA attraverso la valutazione di tre proteine transmembrana appartenenti al RE, la protein kinase RNA (PKR) like ER kinase (PERK), l'*inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), e l'*activating transcription factor 6* (ATF6) [11]; in particolare verrà studiato l'asse PERK/eIF2, riconosciuto come il principale pathway coinvolto nei disturbi neurodegenerativi. Inoltre, sarà indagato il pathway che lega lo stress del RE con i miRNA e la loro espressione nella patologia oggetto della proposta progettuale, con particolare attenzione al miRNA221 la cui espressione subisce una regolazione negativa nella MA [12]. Successivamente verrà effettuato un profilo di espressione dei miRNA in un modello murino precoce di MA indotto mediante iniezione intracerebroventricolare di una soluzione di oligomeri A β_{1-42} [13]. A questo scopo saranno impiegati specifici arrays che permettano di identificare i principali miRNA coinvolti nei meccanismi di neurodegenerazione. I miRNA significativamente deregolati saranno poi validati in un assay singolo e i loro potenziali target identificati attraverso supporti digitali (per esempio, miRTarBase) e la loro espressione misurata mediante real-Time PCR, ELISA o western blotting a seconda del target. Durante gli studi *in vivo* i topi saranno sottoposti ad una batteria di test comportamentali prima del sacrificio per valutarne le capacità cognitive, mnesiche e di apprendimento. Al termine dell'analisi comportamentale, saranno effettuate le analisi biomolecolari per valutare i livelli di stress ossidativo, la

morte neuronale, il coinvolgimento dei principali pathway coinvolti nella sopravvivenza neuronale e la funzionalità sinaptica. Una volta identificati i pathway molecolari e i miRNA coinvolti nelle fasi dello studio precedenti, essi saranno validati nella seconda fase della proposta progettuale. L'obiettivo di questa fase sarà quello di validare i pathway e i miRNA identificati nella fase precedente su campioni biologici di soggetti sani e di pazienti selezionati affetti da MA o demenza in diversi stadi di progressione della malattia.

Infine, saranno identificate possibili strategie neuroprotettive impiegando composti bioattivi multifunzionali, o pathway cellulari identificati nelle fasi precedenti. Per prima cosa sarà valutato il profilo di sicurezza di tali composti al fine di escludere effetti citotossici e genotossici. Successivamente, i composti identificati come promettenti agenti neuroprotettivi saranno studiati su un modello murino precoce di MA [13].

Riassumendo i principali obiettivi del presente progetto sono:

1. l'identificazione dei pathway coinvolti nel processo neurodegenerativo che possono svolgere un ruolo anche nei meccanismi di neuroprotezione;
2. la validazione di tali pathway nel paziente;
3. l'identificazione di possibili strategie neuroprotettive grazie alle molecole e ai pathway identificati e validati nei punti precedenti.

Bibliografia

1. Giannakopoulos, P.; Hof, P. R.; Bouras, C. Selective vulnerability of neocortical association areas in Alzheimer's disease. *Microsc. Res. Tech.* 1998, 43, 16–23.
2. Reitz, C.; Mayeux, R. Use of genetic variation as biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009, 1180, 75–96.
3. Kaushik, S.; Cuervo, A. M. Proteostasis and aging. *Nat. Med.* 2015, 21, 1406–15.
4. Hutt, D. M.; Powers, E. T.; Balch, W. E. The proteostasis boundary in misfolding diseases of membrane traffic. *FEBS Lett.* 2009, 583, 2639–46.
5. Duran-Aniotz, C.; Martínez, G.; Hetz, C. Memory loss in Alzheimer's disease: are the alterations in the UPR network involved in the cognitive impairment? *Front. Aging Neurosci.* 2014, 6, 8.
6. Walter, P.; Ron, D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* (80-.). 2011, 334, 1081–1086.
7. Wu, Q.; Ye, X.; Xiong, Y.; Zhu, H.; Miao, J.; Zhang, W.; Wan, J. The Protective Role of microRNA-200c in Alzheimer's Disease Pathologies Is Induced by Beta Amyloid-Triggered Endoplasmic Reticulum Stress. *Front. Mol. Neurosci.* 2016, 9, 140.
8. Nolan, K.; Walter, F.; Tuffy, L. P.; Poeschel, S.; Gallagher, R.; Haunsberger, S.; Bray, I.; Stallings, R. L.; Concannon, C. G.; Prehn, J. H. M. Endoplasmic reticulum stress-mediated upregulation of miR-29a enhances sensitivity to neuronal apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 2016, 43, 640–652.
10. Cummings, J. Disease modification and Neuroprotection in neurodegenerative disorders. *Transl. Neurodegener.* 2017, 6, 25.
11. Halliday, M.; Hughes, D.; Mallucci, G. R. Fine-tuning PERK signaling for neuroprotection. *J. Neurochem.* 2017, 142, 812–826.
12. Manzine, P. R.; Pelucchi, S.; Horst, M. A.; Vale, F. A. C.; Pavarini, S. C. I.; Audano, M.; Mitro, N.; Di Luca, M.; Marcello, E.; Cominetti, M. R. microRNA 221 Targets ADAM10 mRNA and is Downregulated in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2017, 61, 113–123.

13. Morroni, F.; Sita, G.; Tarozzi, A.; Rimondini, R.; Hrelia, P. Early effects of A β 1-42 oligomers injection in mice: Involvement of PI3K/Akt/GSK3 and MAPK/ERK1/2 pathways. *Behav. Brain Res.* 2016, 314, 106–115.

PIANO DI FORMAZIONE

I anno

Nel primo anno del progetto il titolare dell'assegno dovrà impiegare un modello murino di MA che prevedere l'iniezione intracerebroventriolare della forma oligomerica del peptide beta amiloide (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 tissutali cerebrali saranno prelevati e l'assegnista utilizzerà le metodiche necessarie per la valutazione dei parametri di bilancio ossidativo, infiammatorio e di morte cellulare; nonché la tecnica del Western Blotting per lo studio semiquantitativo dei pathway coinvolti; in particolare verrà studiato l'asse PERK/eIF2, riconosciuto come il principale pathway coinvolto nei disturbi neurodegenerativi. Inoltre, sarà indagato il pathway che lega lo stress del RE con i miRNA e la loro espressione nella patologia oggetto della proposta progettuale, con particolare attenzione al miRNA221.

II anno

Una volta identificati i pathway molecolari e i miRNA coinvolti nelle fasi dello studio precedenti, essi saranno validati nella seconda fase della proposta progettuale. L'obiettivo di questa fase sarà quello di validare i pathway e i miRNA identificati nella fase precedente su campioni biologici di soggetti sani e di pazienti selezionati affetti da MA o demenza in diversi stadi di progressione della malattia. L'RNA totale sarà quindi estratto dai campioni di sangue dei pazienti con il kit di isolamento PAXgene Blood RNA, e su di esso verrà poi effettuato un profilo di espressione dei miRNA e quelli significativamente deregolati saranno poi analizzati singolarmente.

Il piano di formazione proposto vuole fornire competenze specifiche da acquisire presso i Laboratori di Tossicologia Sperimentale 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
- L'analisi biomolecolare della condizione infiammatoria e ossidativa cellulare e tissutale, nonché dell'attivazione dei pathway responsabili della morte cellulare
- La valutazione comportamentale, motoria e cognitiva, dei modelli murini impiegati e loro sviluppo e mantenimento
- L'analisi immunoistochimica in fluorescenza
- L'analisi del profilo di espressione dei miRNA con miRNA-microarray

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