

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Tesi di Dottorato in Farmacologia Clinica e Preclinica  
Ciclo XXIV

---

---

NICOLE RONSISVALLE

Effetti protettivi del 1-(3',4'-Dichloro-2-fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-cyclo-propanecarboxylic Acid (CHF5074) su cellule neuronali sottoposte a stimoli tossici in vitro.

---

TESI SPERIMENTALE DI DOTTORATO

---

*Coordinatore del Dottorato:*

*Chiar.mo Prof. Renato Bernardini*

*Tutor:*

*Chiar.ma Prof.ssa Rosa Chillemi*

---

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

*“Immaginate il vostro cervello come una casa illuminata. Ora immaginate che qualcuno spenga le luci una ad una; questo è quello che fa l’Alzheimer. Spegne la luce in una stanza e poi nell’altra e le idee, le emozioni e la memoria si affievoliscono e cessano del tutto.”*

*Madeline Nash*

*Time, Luglio 2000*

<b>1. Introduzione</b>	
1.1. La Demenza	5
1.2. La Neurodegenerazione	8
1.3. La malattia di Alzheimer	12
1.3.1 Le Basi molecolari della malattia di Alzheimer	14
<b>2.Trail Patway</b>	<b>21</b>
2.1. Via estrinseca dell'apoptosi	22
2.2. Via intrinseca dell'apoptosi	24
2.3 Trail nella neurodegenerazione	26
<b>3. Trattamento Farmacologico</b>	<b>27</b>
3.1. Ipotesi Colinergica	28
<b>4. Scopo della ricerca</b>	<b>35</b>
<b>5. Materiali e Metodi</b>	<b>43</b>
<b>6. Risultati</b>	<b>51</b>
<b>7. Discussione</b>	<b>57</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>58</b>
<b>9. RINGRAZIAMENTI</b>	<b>68</b>

# 1.Introduzione

## 1.1 La Demenza

Attualmente il termine di demenza non viene associato a una malattia, ma a una sindrome che prevede l'esistenza di un quadro clinico principale condiviso da differenti processi patologici. Vi è sempre una compromissione importante della memoria e di almeno un altro dominio cognitivo, senza che sia alterato lo stato di coscienza<sup>1</sup>. Vengono alterati l'apprendimento, il linguaggio sino all'afasia, la capacità di risolvere i problemi, l'orientamento, il deficit del pensiero astratto e la capacità di critica. Tutto questo è il risultato di una disfunzione cronica o progressiva delle funzioni corticali e sottocorticali del Sistema Nervoso Centrale<sup>2</sup>.(Tab1)

Demenza corticale	Demenza sottocorticale
Afasia precoce	No afasia (anomia, incapacità a percepire se grave)
Compromissione della memoria di richiamo e di riconoscimento	Compromissione della memoria di richiamo (rievocativa) maggiore della compromissione della memoria di riconoscimento (codificante)
Capacità di calcolo compromesse precocemente	Capacità di calcolo conservate sino alle fasi tardive
Compromissione parallela alle altre funzioni della capacità esecutiva	Compromissione non proporzionale alle altre funzioni della capacità esecutiva
Velocità del processo cognitivo normale sino alle fasi tardive	Velocità del processo cognitivo interessata precocemente
Personalità non preoccupata	Personalità apatica, inerte
Umore eutimico	Umore depresso
Parola articolata sino alle fasi tardive	Disartria
Postura, coordinazione, velocità e controllo motorio non compromessi	Postura, coordinazione, velocità e controllo motorio compromessi precocemente
Assenza di movimenti involontari	Presenza di movimenti involontari quali corea, tremori, tic, distonia

**Tab 1.** Differenze tra demenza corticale e demenza sottocorticale

Vale la pena descrivere come si è giunti alla definizione di “demenza”: è stato un percorso arduo per i diversi e complessi aspetti di questa sindrome.

Nel 1797 fu utilizzato per la prima volta il termine *demente*, da Pinel, nella descrizione di malattie che alteravano e annullavano la capacità di pensiero. Fu però il suo allievo Esquirol, nel 1838, a distinguere tra demenza, intesa come processo cerebrale acquisito, e *ritardo mentale* congenito, dando così a questo termine una prima identità clinica.

Per tutto l’ottocento, però, il demente venne confuso con il folle. Soltanto all’inizio del novecento, grazie all’osservazione neuropatologica, ci fu un inquadramento moderno delle demenze: fu opera di Kraepelin, che distinse la *demenza precox* dalle *demenze organiche*<sup>3</sup>, dovute a malattie del SNC.

Nel 1902, Alois Alzheimer individuò nell’arteriosclerosi dei vasi perforanti lunghi della sostanza bianca profonda, l’elemento che portò alla distinzione tra le forme di demenza arteriosclerotiche, effetto di lesioni multiple dei piccoli vasi cerebrali, e le demenze conseguenze di attacchi apoplettici.

Nel 1906, Alzheimer e, successivamente, nel 1910, Perusini e Bonfiglio diedero una svolta fondamentale alla comprensione delle demenze: dimostrarono, infatti, la presenza di un quadro clinico dementigeno senza compromissione vascolare, descrivendo i caratteri istopatologici tipici in forma di degenerazione neurofibrillare e di placche senili<sup>4</sup>. Questa fondamentale osservazione, tuttavia, fu' a lungo misconosciuta, continuandosi a dare risalto alle cause neuro vascolari. Soltanto negli ultimi cinquant'anni si è assistito a un progressivo ridimensionamento di questa teoria, grazie a una conoscenza più precisa del flusso e del metabolismo cellulare.

Nel 1992 furono fissati i criteri per porre la diagnosi di demenza dall'International Classification of diseases e dal Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders e per la diagnosi clinica dell'Alzheimer(Tab 2), nel 1984, sotto l'egida del National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's disease and Related Disorder Association<sup>5-6</sup>.

<p><b>Malattia probabile</b></p> <p><i>Criteri indispensabili</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnosi clinica di demenza</li> <li>• Demenza confermata alla valutazione neuropsicologica</li> <li>• Deficit in due o più aree cognitive</li> <li>• Esordio tra i 40-90 anni</li> <li>• Assenza di malattie sistemiche o di altre malattie cerebrali capaci di compromettere le funzioni cognitive</li> </ul> <p><i>Criteri di supporto</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Decorso cronico-progressivo</li> <li>• Anamnesi familiare positiva</li> <li>• Elettroencefalogramma e rachicentesi negativi</li> <li>• Atrofia cerebrale progressiva (Esami di Neuroimmagine)</li> </ul> <p><i>Criteri a favore di una diagnosi di esclusione</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insorgenza brusca</li> <li>• Esordio con crisi comiziali o con disturbi della marcia</li> <li>• Deficit neurologici focali</li> </ul>
<p><b>Malattia possibile</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnosi di demenza</li> <li>• Presenza di altra possibile causa di demenza</li> <li>• Deficit di una singola funzione cognitiva</li> <li>• Esordio o decorso atipici</li> </ul>
<p><b>Malattia definita</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnosi di malattia probabile</li> <li>• Conferma neuropatologica</li> </ul>

Tab 2. Criteri di diagnosi per la malattia di Alzheimer

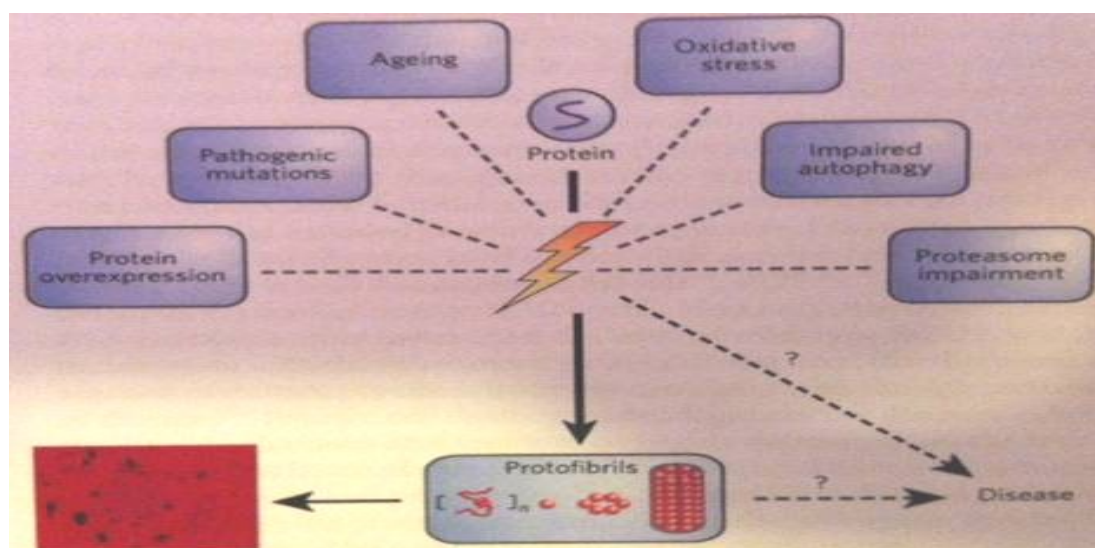
## 1.2 La Neurodegenerazione

Specifiche aree del SNC possono essere colpite da numerose patologie che comportano una progressiva riduzione della componente cognitiva e/o sensitivo-motoria a secondo del target neuronale. Queste patologie sono sempre state difficilmente riconosciute e studiate perché spesso il loro decorso è silente e si nota solo in fase avanzata, quando l'unica



terapia possibile è quella sintomatica. Le malattie neurodegenerative sono: la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, il morbo di Huntington, la Sclerosi Laterale Amiotrofica, la paralisi sopranucleare progressiva, la demenza frontotemporale e la demenza dei corpi di Lewy<sup>7-19</sup>.

E' noto che, nelle fasi iniziali, tali patologie esordiscono con carattere focale, che di solito colpisce bilateralmente uno specifico sistema neuronale esitando in sintomatologie fra le più varie. Le ricerche più avanzate evidenziano un meccanismo patogenetico comune, ovvero, un alterato metabolismo proteico e uno stress ossidativo<sup>8</sup>.(Figura 1)



**Figure1** .Fattori che provocano la formazione di fibrille.

Il meccanismo che causa l'anomala aggregazione proteica è causato da una alterazione dei processi proteolitici e/o dei loro sistemi di controllo.

Ogni volta che si forma una proteina infatti deve assumere la sua configurazione nativa (configurazione terziaria) per poter svolgere la sua funzione, cioè essa deve subire il corretto processo di ripiegamento nella configurazione ad  $\alpha$ -elica o a  $\beta$ -foglietto ad esempio per poter essere in grado di svolgere la sua funzione. Il processo grazie al quale si ripiega viene detto Folding. Il Misfolding al contrario è il mancato raggiungimento della configurazione nativa, cioè il ripiegamento sbagliato che può essere causa di aggregazione proteica<sup>9</sup>. Nei casi in cui l'aggregazione proteica progredisce in maniera insostenibile, i meccanismi di proteolisi non sono sufficienti a contrastare il fenomeno, soccombendo di conseguenza. Si ha così la formazione di fibrille insolubili, che si distribuiscono in tipiche zone del cervello e causano manifestazioni cliniche diverse a seconda della patologia che le genera.

L'accumulo di proteine dispiegate o malpiegate nel lume del reticolo endoplasmatico causa l'attivazione dell'Unfolded Protein Response. E' una risposta di stress cellulare, che inizialmente cerca di ripristinare la funzione neuronale della cellula attraverso l'interruzione della sintesi proteica e successivamente incrementa la produzione di chaperones molecolari coinvolti nel ripiegamento proteico. Se questi obiettivi non vengono raggiunti entro un certo tempo, si inzializza la morte cellulare programmata (apoptosi). La capacità proteolitica e i sistemi di controllo tendono a diminuire con l'avanzare dell'età. Ciò potrebbe spiegare alcune malattie neurodegenerative, che vengono chiamate Amiloidosi<sup>10</sup>, come appunto il morbo di Alzheimer, la malattia di Huntington e il morbo di Parkinson. Nell'Alzheimer, per esempio, il peptide beta amiloide (APP) è considerato il responsabile della formazione delle placche extracellulari e la sua proprietà fibrillogena sembra essere associata alla conversione strutturale da alfa elica a foglietto beta<sup>11</sup>.

Il genoma mitocondriale può avere un importante ruolo nella patogenesi di queste malattie e l'evidenza che i mitocondri siano un sito di danno nelle malattie neurodegenerative si basa in parte sulla riduzione dell'attività della catena respiratoria<sup>12</sup>.

I meccanismi che coinvolgono i radicali liberi e gli antiossidanti si reggono su un delicato equilibrio fisiologico, ma che talvolta degenera provocando un'accelerazione di invecchiamento dei tessuti. Si determina infatti un processo di stress ossidativo che diviene cronico provocando un disequilibrio nella cellula tra produzione di ROS ( $H_2O_2$  e i radicali  $OH^\bullet, O_2^\bullet$ ) e ridotta capacità di difesa degli antiossidanti<sup>13</sup>. L'elevata concentrazione di ROS, rilasciati dalla disregolazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale, espone la cellula a un processo a cascata che è di ostacolo al trasporto intracellulare di glutammato. Questo, depositandosi negli spazi intersinaptici, determina una stimolazione continua dei recettori, causando apoptosi<sup>14</sup>.

## 1.3 La malattia di Alzheimer

Nel mondo all'incirca 26 milioni di persone soffrono di demenza. Si accertano circa 4,6 milioni di nuove diagnosi ogni anno e purtroppo si ha ragione di pensare che tale numero nei prossimi vent'anni raddoppierà<sup>15</sup>.(Figura 2)

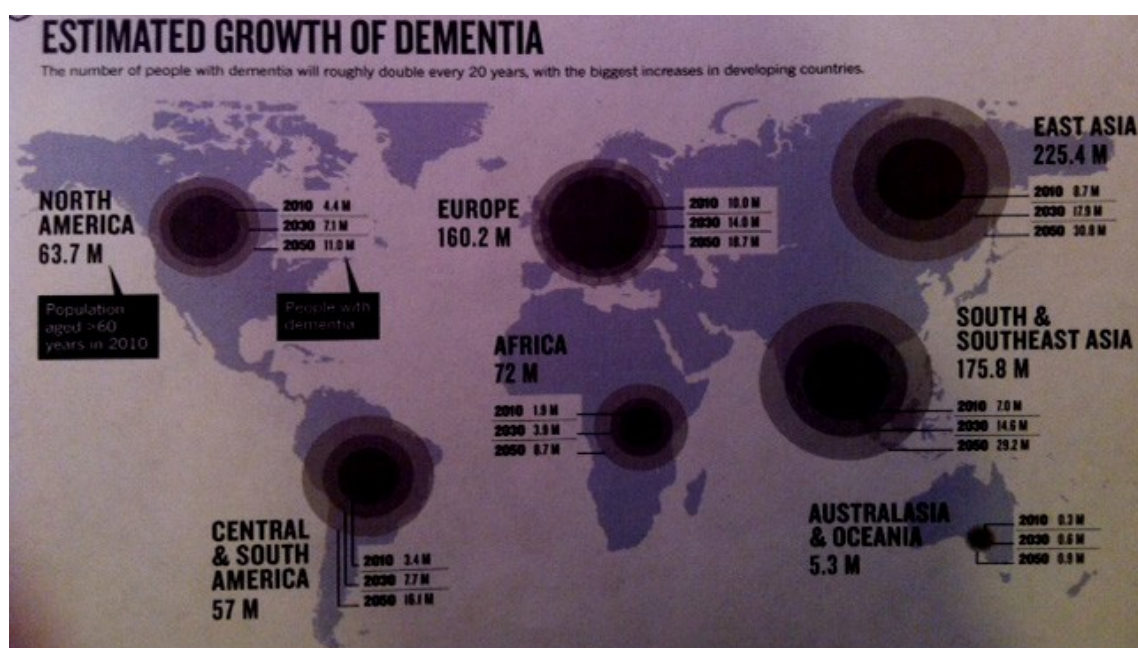


Figura 2. Prospettive di demenza nei prossimi vent'anni nel mondo.

Fra le malattie neurodegenerative, l'Alzheimer è la più comune. Si manifesta nell'80% dei casi e colpisce 15 milioni di persone al mondo, di cui 3 milioni in Europa e 430/450 mila persone in Italia. La prima spiegazione di questi numeri sconcertanti è demografica, in quanto, pur essendo nel 50-60% una demenza

senile, sta diventando uno dei maggiori problemi sanitari a causa dell'invecchiamento della popolazione mondiale. Uno studio condotto dall'UK Alzheimer's Research Trust ha stimato il costo annuale delle demenze in £23 bilioni (US \$ 38 bilioni), a fronte di £12 bilioni per il cancro.

Seguono a distanza i costi per le patologie cardiovascolari (£ 8 bilioni) e per l'ictus (£ 5 bilioni)<sup>15</sup>.

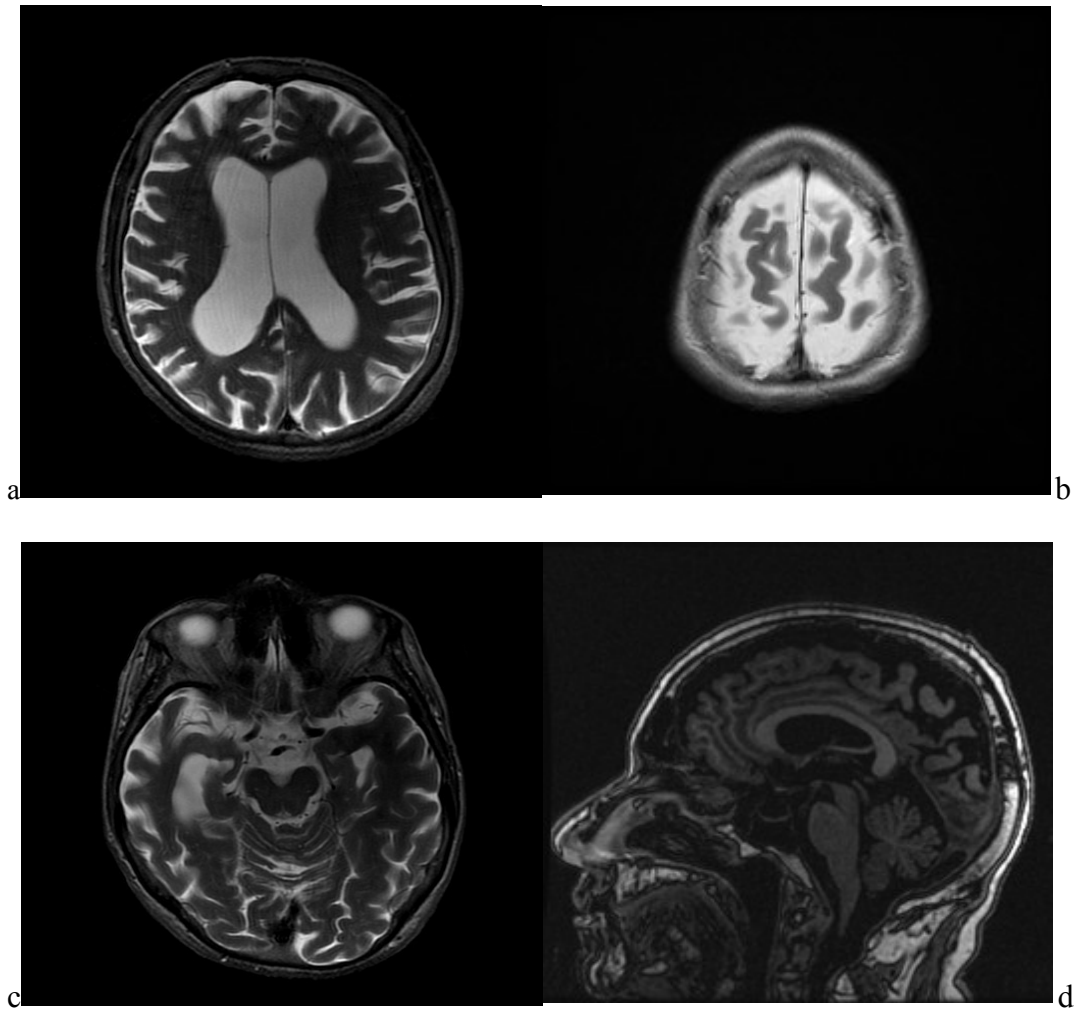
### **1.3.1 BASI MOLECOLARI DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER**

La malattia di Alzheimer, è un disordine neurodegenerativo che ha un tipico pattern di sviluppo coinvolgendo inizialmente l'ippocampo, con il giro ippocampale e l'amigdala posizionato nella porzione mesiale del lobo temporale e strettamente connessi con la corteccia entorinale e perinale la quale a sua volta proietta fibre a giro dentato, attraverso i neuroni CA3-CA1 dell'ippocampo, fino al subiculum e da qui di nuovo indietro alla corteccia entorinale; tali regioni costituiscono il circuito di Papet fondamentale nei processi mnesici e gravemente colpito nella malattia di Alzheimer. Il paziente

affetto da tale patologia, in particolare nelle fasi precoci, ha una condizione patologica particolare di “deaffertazione limbica”. Il sistema limbico (circuito di Papet), infatti, costituito da ippocampo e nuclei dell’amigdala, serve a mantenere la capacità di apprendimento, di memoria e di equilibrio emotivo. In questa particolare condizione, invece, l’informazione sensoriale, trasmessa dalle aree corticali primarie a quelle associative, non può essere più integrata tramite il passaggio del sistema limbico e questo causa le deficienze<sup>3</sup>.

Studi post-mortem di cervelli malati hanno permesso di caratterizzare la malattia a livello macroscopico: mostrano una marcata atrofia a livello cerebrale, che determina col tempo a un aumento dell’ampiezza dei solchi cerebrali e un aumento del volume ventricolare attribuibile alla perdita di cellule neuronali.

(Figura3.)

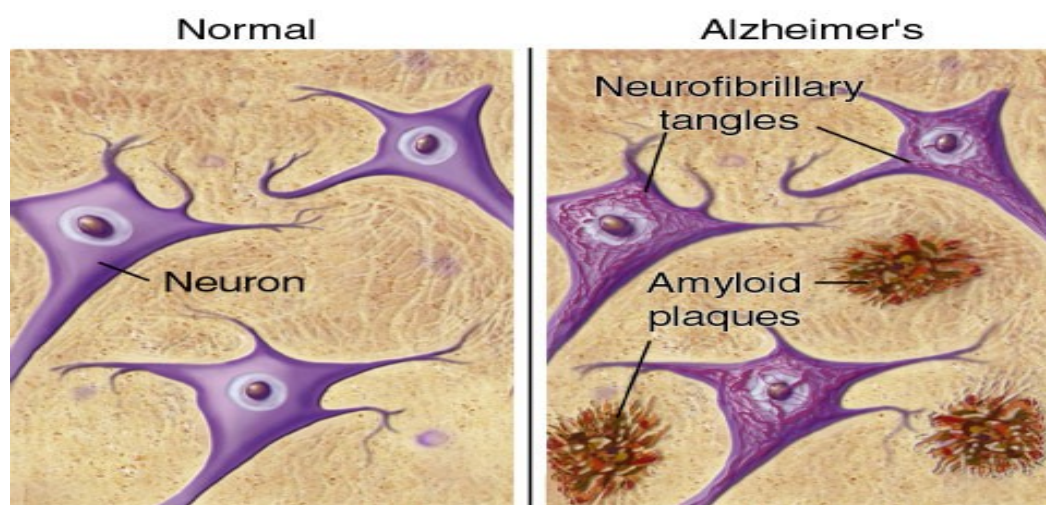


**Figura 3.**

- (a) DILATAZIONE EX-VACUO DEI VENTRICOLI LATERALI PER ATROFIA CORTICALE FRONTO-PARIETALE
- (b) ATROFIA REGIONE IPPOCAMPALE ED ATROFIA DEI LOBI TEMPORALI.
- (c) ATROFIA DELLA CORTECCIA DELLA CONVESSITA' FRONTO-PARIETALE BILATERALMENTE.
- (d) ATROFIA DELLA CORTECCIA FRONTO-PARIETO-OCCIPITALE



A livello istologico si ha la presenza di placche senili o neuritiche costituite da una proteina extracellulare  $\beta$ -amiloide e da grovigli neurofibrillari intracellulari causati dall'iperfosforilazione della proteina tau<sup>16</sup>.(Figura 3)



**Figura 4.** Placche di Amiloide $\beta$  e grovigli neurofibrillari.

Nel 1984 George Glanner e Caine Wong evidenziarono che la sostanza “cementante” di Alzheimer e Perusini era una particolare proteina  $\beta$ -amiloide, derivata dalla proteolisi della proteina precursore dell'amiloide APP.(Figura 4)

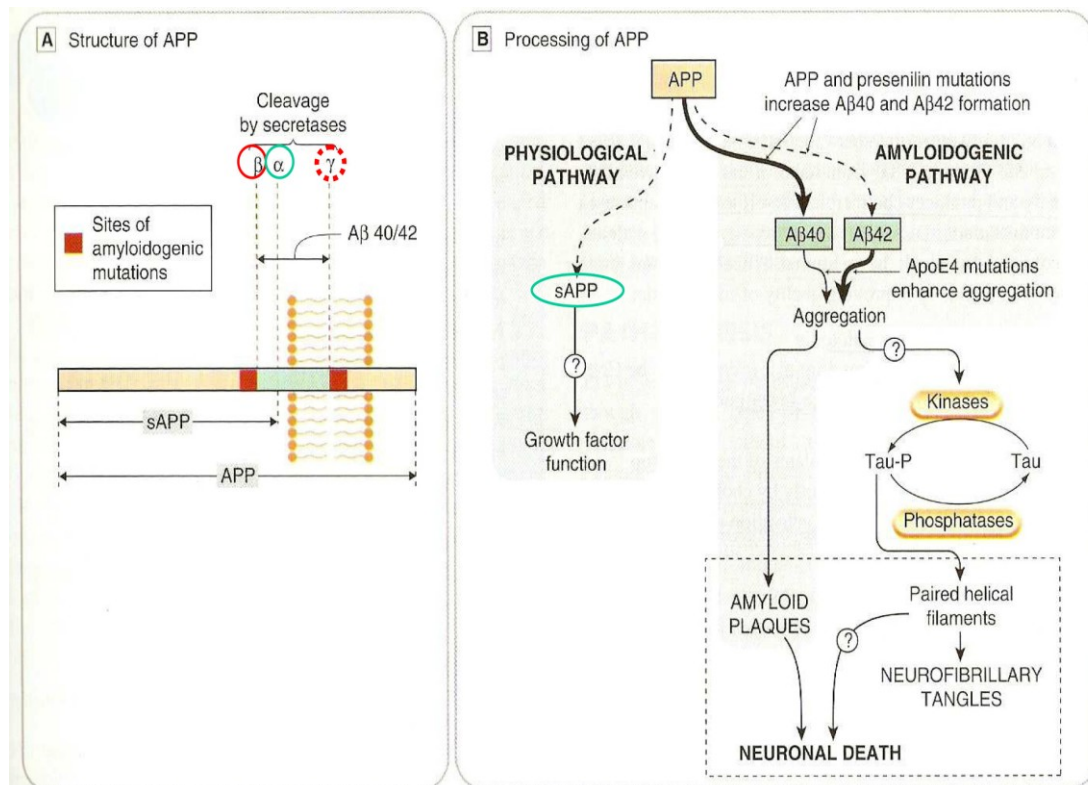


Figura 5. Struttura e Clivaggio dell'APP.

I tre enzimi proteolitici sono: **α-secretase**, **β-secretase** e **γ-secretase**.

Se il taglio è operato da α-secretase viene originato un frammento normale (p3); se invece APP è tagliata da β-secretase e γ-secretase si dà origine rispettivamente:

**β Secretase o (BACE-1)** → taglia l' N-terminale dell'APP generando un frammento C-terminale ancorato alla membrana e un frammento N-terminale solubile sAPP.

$\gamma$ -secretase → opera il taglio sul frammento C-terminale generando un peptide “APP intracellular domain” ed i peptidi di  $\beta$  proteina:  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{1-42}$  quest’ultimo è la versione patologica per la sua tendenza ad aggregarsi<sup>17</sup>.

Il supporto per molti componenti cellulari è costituito dai microtubuli, polimeri cilindrici, rigidi, costituiti da tubulina  $\alpha$  e tubulina  $\beta$ <sup>18</sup>. All’interno della cellula essi hanno svariate funzioni :

1. permettono il trasporto intracellulare di vescicole
2. partecipano alla formazione del fuso mitotico nella mitosi
3. controllano il corretto posizionamento degli organelli
4. operano nello sviluppo e nel controllo della plasticità neuronali influenzando il mantenimento degli assoni e dei dendriti.

I comportamenti dei microtubuli nelle cellule non possono essere spiegati solo dalla proprietà della tubulina pura, in quanto utilizzano delle proteine associate (MAP). Sono all’incirca una dozzina, tra tutte evidenziamo la proteina Tau, che è la principale MAP negli assoni dei neuroni cerebrali ed è

presente nei corpi cellulari di alcuni neuroni e nelle cellule gliali. I membri della famiglia sono: MAP2(localizzate nei dendriti dei neuroni) /MAP4(localizzate nelle cellule gliali del sistema nervoso)<sup>18</sup>. In presenza della proteina Tau i microtubuli crescono tre volte più velocemente, si accorciano più lentamente e subiscono danni con una frequenza solo del 2% rispetto ai microtubuli senza proteine. Nella malattia di Alzheimer, la proteina Tau viene iperfosforilata in più di 22 siti diversi e ciò causa la perdita di legame tra Tau e i microtubuli. I frammenti della proteina libera si aggregano in grovigli neurofibrillari e ciò causa problemi di comunicazione interneuronale, respirazione mitocondriale e trasporto assonale. Tutti questi problemi portano ad apoptosi incontrollata del neurone<sup>18</sup>.

Oggi ancora non è nota la specie molecolare che causa la degenerazione neuronale per questa via, ma l'inibizione di quelle chinasi, che danno inizio alla conversione di tau in grovigli, potrebbe rappresentare una valida strategia terapeutica.

La ricerca si sta concentrando anche su un altro meccanismo che può innescare il processo infiammatorio dei neuroni che li porterà poi a degenerazione con perdita di sinapsi e quindi a morte: è la variante neuroinfiammatoria dell'ipotesi della cascata dell'amiloide<sup>20</sup>.

Secondo questa ipotesi  $A\beta$  è responsabile indirettamente della fosforilazione di Tau e della conseguente degenerazione neurofibrillare per mezzo dell'attivazione della microglia.

L' $A\beta$  si deposita a livello corticale aggregandosi in placche e conducendo uno stimolo infiammatorio che stimola il rilascio di fattori neurotossici che si rendono responsabili del danno ossidativo e del depauperamento del contingente neuronale.

### 3. Trail Pathway

Trail (TNF-related apoptosis-inducing ligand) è il ligando della famiglia TNF con la più alta omologia con FAS/APO-1<sup>21</sup>. È una proteina transmembrana di tipo II con una regione extracellulare lunga C-terminale (è responsabile del legame al recettore specifico), ed una regione N-terminale corta. Diversi studi hanno dimostrato la capacità di TRAIL di innescare l'apoptosi attraverso l'attivazione di due recettori agonisti TRAIL-R1(DR4)<sup>22</sup> e TRAIL-R2(DR5)<sup>23</sup>. Entrambi contengono il Death Domain (DD) intracellulare. I recettori antagonisti (decoy receptors) DCR1(TRAIL-R3)<sup>24</sup> e DCR2(TRAIL-R4)<sup>25</sup> sono caratterizzati dal non avere, oppure avere, in una forma tronca non funzionante, il DD. Per questo non sono in grado di trasmettere il segnale apoptotico. La funzione di queste due forme è quella di competere con DR4 e DR5 per il legame con il ligando così da non far iniziare il processo apoptotico.

Un altro recettore antagonista è l'osteoprotegerina (OPG) che lega un altro membro della famiglia TNF ma non induce apoptosi<sup>26</sup>.

Abbiamo due vie per l'attivazione dell'apoptosi<sup>29</sup> (Figura 5):

-via estrinseca o recettoriale (TRAIL)

-via intrinseca o mitocondriale.

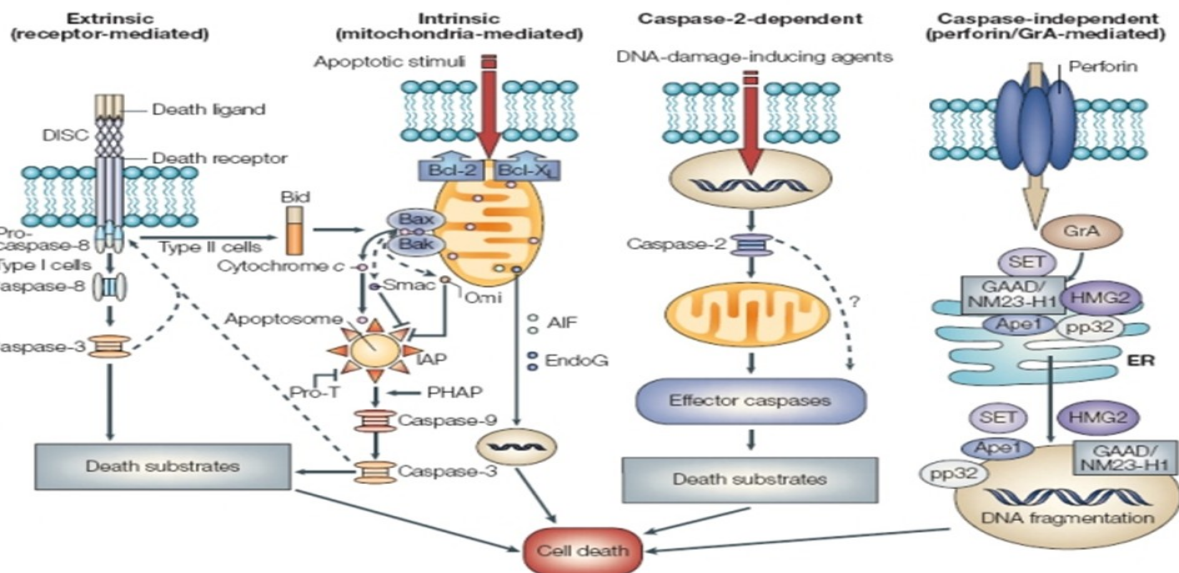


Figure6. Le principali vie apoptotiche

## 2.1 VIA ESTRINSECA

All'interno della famiglia dei TNF-R, il recettore più coinvolto nella segnalazione apoptotica è il FAS. Questo recettore è presente sulla membrana plasmatica di ogni cellula ed è

costituito da un dominio extracellulare, utile per il legame con il ligando specifico (FASL), un dominio transmembrana e una regione citoplasmatica che contiene il DD necessario per innescare il processo apoptotico. Quando il ligando si lega allo specifico recettore FAS/R FAS/L, la proteina FADD (Fas Associated Death Domain)<sup>27</sup> si aggancia, da un lato, al dominio di morte citoplasmatico del recettore e, dall'altro, ha un dominio chiamato DED (Death Effector Domain), con il quale si lega ad alcune caspasi, dette regolatrici, tra le quali la pro-caspasi 8, creando così il DISC (Death-inducing signaling complex)<sup>28</sup>. La dimerizzazione di pro-caspasi 8 e la conseguente formazione di DISC causa la formazione della Caspase8 matura, che attiva a valle le caspasi effettrici 3,7,6 che eseguono l'apoptosi.



## 2.1 VIA INTRINSECA

Il mitocondrio ha due membrane: una interna e una esterna. Esistono punti in cui le membrane sono molto vicine. I ricercatori hanno identificato nelle cellule che vanno incontro ad apoptosi, la formazione, in queste zone, di PTP (pori di permeabilità transitoria). In corrispondenza di queste strutture vi sono proteine che formano una struttura canale:

VDAC → canale per gli anioni voltaggio-dipendenti e si trova sulla membrana esterna

ADNT → sotto VDAC sulla membrana interna ed è un trasportatore dei nucleotidi adenilici che consente all'ADP di entrare nel mitocondrio per essere trasformato in ATP.

La formazione di ATP è garantita dall'enzima  $FOF_1$  ATPasica che sfrutta un gradiente della pompa protonica per sintetizzare ATP.

Il gene  $Bcl_2$  ha un ruolo fondamentale all'interno del mitocondri, perché ne garantisce il funzionamento. Infatti, grazie al  $-COOH$  terminale, si integra nella membrana

mitocondriale e garantisce l'apertura del canale, mantenendo così la funzione ATP-asi → funzione ANTIAPOPTOTICA.

Se la cellula riceve invece un segnale apoptotico BAX (proteina pro-apoptotica) arriva in prossimità del gene Bcl<sub>2</sub> e lo blocca attraverso BID (proteina pro-apoptotica). BID non è attivo come tale, ma deve essere troncato dalla caspasi 8 in tBID. Se essa lo inattiva, allora vi è la chiusura del canale. Si determina allora l'impossibilità di ADP di entrare nel mitocondrio e quindi non si ha uscita di ATP. La cellula non per questo muore in quanto comunque ha una scorta di ATP. Il problema si pensa sia dovuto a un accumulo di idrogenioni H<sup>+</sup>, prima a livello del mitocondrio e poi nel citosol, e questa acidificazione è il segnale che attiva BAX o BAK. A questo punto il canale sarà per sempre chiuso e scatta il processo esecutivo, ovvero vi è l'apertura dei PTP funzionando in maniera opposta rilasciando fattori importanti per l'attivazione della Procaspase-9: APAF-1 e Citocromo C. Questi due fattori interagiscono con il dominio CARD della pro-caspase9 e lo attivano e a sua volta attiverà attraverso taglio proteolitico le

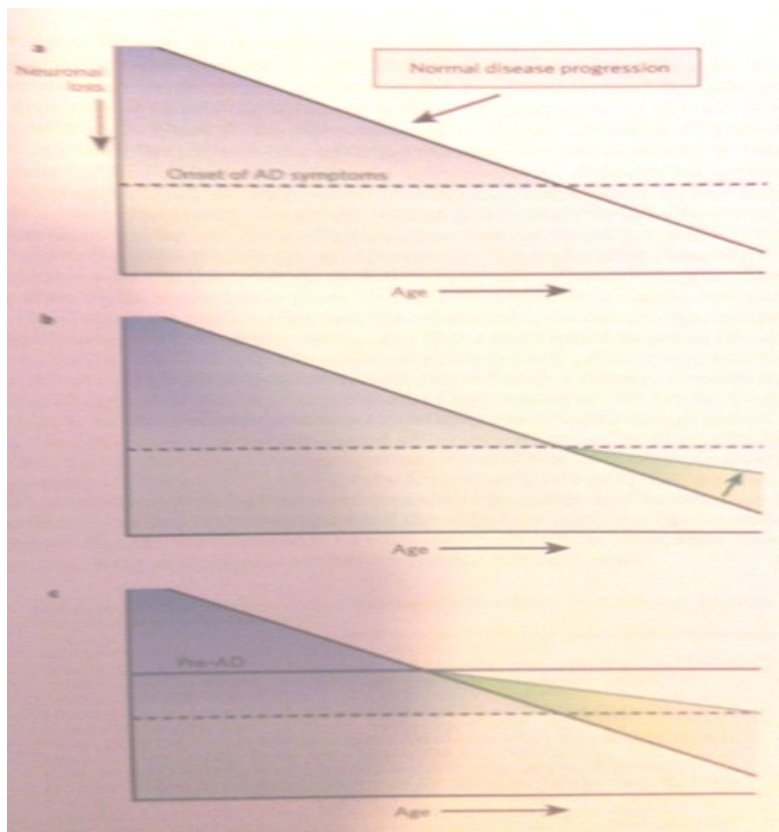
caspasi esecutrici 3,6,7. Le cellule hanno sistemi che controllano l'attivazione delle caspasi per non far sì che siano attivate in maniera casuale e nel citosol hanno degli inibitori naturali IAP che legano le caspasi e impediscono che vengano degradate da qualsiasi proteasi. Durante la formazione dell'apoptosoma, oltre la fuoriuscita di citocromo c e Apaf 1, uscirà anche una proteina proapoptotica in grado di inattivare le IAP → SMAC/DIABLO<sup>30</sup>.

### **2.3 TRAIL NELLA NEURODEGENERAZIONE**

Nel 2003, Cantarella et al.<sup>31</sup>, hanno riportato che Trail protegge le cellule neuronali dalla tossicità di A $\beta$ mioloide e lo stesso gruppo ha anche riportato che TRAIL è espressa nei cervelli malati di AD ed è completamente assente nei cervelli dei pazienti sani. Questi dati portano ad avanzare l'ipotesi che il pathway di Trail possa essere coinvolto nei processi neurodegenerativi dell'Alzheimer.

### 3. Il trattamento Farmacologico

Dalla scoperta e caratterizzazione della malattia di Alzheimer sono state avanzate diverse ipotesi sul meccanismo di decorrenza della malattia, tutte basate sull'osservazione del comportamento dei malati. Il risultato finale del processo è la morte delle cellule neuronali e cessazione della trasmissione colinergica. Questo perché la diagnosi della malattia viene fatta esclusivamente all'insorgenza dei sintomi<sup>8</sup>.(Figura 6)



**Figura 7.** La diagnosi e il trattamento migliore sarebbe presintomatica per ridurre drasticamente l'incidenza e la prevalenza di malattie neurodegenerative:

(a) un diagramma che mostra la perdita di neuroni funzionali nel tempo. La diagnosi clinica si verifica quando la malattia è ben avviata, in quanto i sintomi non diventano evidenti. (b) Introduzione di un farmaco che rallenta la progressione della malattia / perdita neuronale, se iniziata al momento della diagnosi clinica, può avere un effetto significativo sugli effetti della malattia. (c) se lo stesso farmaco fosse somministrato a pazienti diagnosticati presintomaticamente.

Le ipotesi di una patofisiologia del sistema colinergico e delle proteine amiloidi e tau sono tuttora prevalenti.

### **3.1 IPOTESI COLINERGICA**

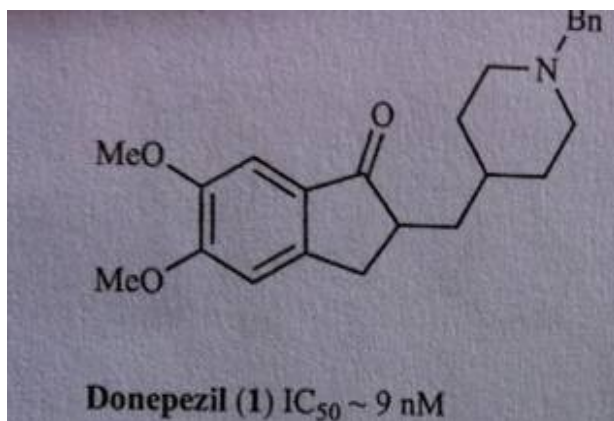
Nei malati di Alzheimer la concentrazione di acetilcolina (ACh) nelle giunzioni neuronali colinergiche del SNC coinvolte nelle funzioni cognitive è di molto più bassa se paragonata a quella dei pazienti sani<sup>32</sup>. Questo fenomeno è ascrivibile a diversi fattori, ma in primo luogo ad una scarsa funzionalità dell'enzima acetyl-CoA (colina acetiltrasferasi)<sup>33</sup>. I risultati di questo calo sono disordini cognitivi con i primi sintomi di demenza, depressione e incapacità di preoccuparsi di sé stessi. Questo processo può anche essere visto come uno sbilanciamento della funzione metabolica di Acetil e Butiril colinesterasi rispetto a quella dell'efficacia dell'azione dell'enzima colina acetiltrasferasi. Tutti questi enzimi infatti giocano un ruolo importante nella patologia, sia quelli preposti

alla sintesi dell'Ach che quelli preposti alla sua degradazione metabolica<sup>34-35</sup>.

Diverse ricerche hanno evidenziato il ruolo dell' AchE nell'induzione dell'aggregazione delle fibrille di beta-amiloide. Nell'azione di questo enzima è stato evidenziato un ruolo importante per il cosiddetto "sito anionico periferico". Tale sito è però assente nella Butiril colinesterasi. Poiché anche questo enzima ha un ruolo nella formazione di aggregati neurotossici nel cervello è evidente che il meccanismo di intervento dei due enzimi è probabilmente differente.

L'Acetil colinesterasi è prevalentemente sintetizzata e localizzata nel SNC, dopo l'insorgere della malattia di Alzheimer esso rapidamente si dissipa<sup>36-37</sup>. In contrasto la Butiril colinesterasi è ampiamente distribuita in tutto il corpo e man mano che la malattia progredisce, il rapporto B/A aumenta e il ruolo degradativo della Acetil colinesterasi viene trasferito alla Butiril colinesterasi. Occorre tenere conto di ciò nello sviluppo di molecole attive come inibitori per potere gestire situazioni patologiche a diverso livello di progressione<sup>38-39</sup>.

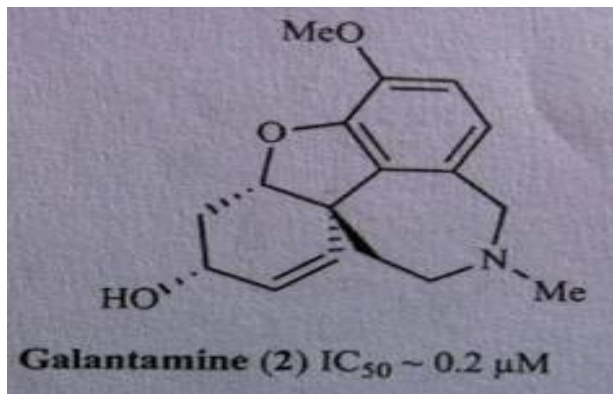
Nei primi stadi della malattia per evitare un rapido insorgere dei sintomi di demenza si usano *inibitori selettivi dell'AChE*. Il Donepezil è commercializzato come Aricept<sup>R</sup>. È una benzilpiperidina che mostra una selettività 100 volte maggiore per AChE rispetto alla BuChE e con un  $IC_{50}=9\text{nM}$  di circa  $IC_{50}=1000\text{nM}$  rispettivamente<sup>40-41</sup>.



Il preparato ha una vita media abbastanza alta (circa 70h) e quindi presenta il vantaggio di non dovere essere somministrato frequentemente e di avere ridotti effetti collaterali<sup>42</sup>. In qualche modo il farmaco occupando l'intera cavità dove è presente il sito attivo dell'enzima raggiunge l'effetto di prevenire l'aggregazione di fibrille amiloidee ( $A\beta_{1-40}$ ). Questo effetto avviene nelle misure sperimentali già con una concentrazione  $100\mu\text{M}$  di Donepezil (22% di inibizione)<sup>43</sup>.

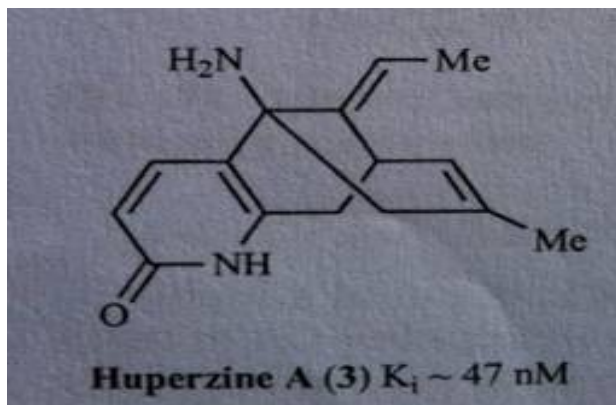
La Galantamina è un'alcaloide isolato per la prima volta dai bulbi e dai fiori della specie Galanthus ed è circa 50 volte più selettivo per la AChE rispetto alla BuChE e con una

$IC_{50} = 0.2 \mu M^{41}$ .



Se vogliamo completare il confronto con il Donazepil va detto che la vita media è di solo 4-6h e avendo una potenza più bassa è considerato un moderato inibitore della AChEI. Il vantaggio della Galantamina sta nella sua attività di agonista dei recettori nicotinici dell'acetilcolina<sup>44-45</sup>.





Infine l'Huperzina, alcaloide isolato dalla *Huperzia serrata* ha una selettività verso l'AChE con una IC<sub>50</sub> di soli 47nM e 1000nM per la BuChE ed è usato come integratore dietetico<sup>46</sup>. Sebbene attualmente non è commercializzato come farmaco anti Alzheimer esso ha mostrato un promettente progresso nelle capacità cognitive in trial clinici con pazienti malati<sup>42-47</sup>. Agisce anche come antagonista NMDA e aumenta il livello di NGF nei ratti<sup>48</sup>.

***L'inibizione della BuChE*** può invece essere molto importante in una fase avanzata della malattia per rallentare un ulteriore perdita di capacità mentali e cognitive per la perdita di neuroni colinergici<sup>36-37</sup>. La Tacrina è stato il primo inibitore della BuChE ad essere sviluppato<sup>42</sup>. Sebbene selettivo mantiene ancora attività inibente verso l'azione della AcHe (IC<sub>50</sub>=6 e

270nM) rispettivamente. A causa della sua epatotossicità e della sua breve emivita non è più in uso terapeutico<sup>42-49-50</sup>.

Per aumentare la potenza e cercare di aumentare la selettività verso l'AChE sono stati sviluppati *ligandi bivalenti*.<sup>51</sup> Il concetto su cui sono basati è che sia possibile ottenere questo sintetizzando molecole contenenti due farmacofori separati da una opportuna catena distanziatrice di diversa lunghezza e di adeguate proprietà chimico-fisiche in modo da ottenere il binding simultaneo con il sito catalitico dell'enzima e un sito accessorio periferico. Sono state sintetizzate molecole con due unità di Tacrina e catene alchilidene di lunghezza variabile. Questi primi ligandi bivalenti derivati dalla Tacrina sono risultati 10.000 volte più potenti e 1000 volte più selettivi della Tacrina<sup>52</sup>. Con questa strategia sono state ottenute molecole con diversa selettività e potenza. È stata definitivamente così confermata l'ipotesi che bloccando contemporaneamente il sito PAS dell'AChE si previene l'aggregazione della proteina  $\beta$  Amiloide promossa dall'enzima<sup>40</sup>. Ibridi tacrina-melatonina sviluppati da Rodriguez-Franco et al. hanno una affinità per

l'AChE e per la BuChE dell'ordine pico e nanoM. Questo composto mantiene anzi migliora la proprietà di scavenger di ROS propria della melantonina<sup>53</sup>.

Nel progettare ad hoc *agonisti colinergici* per ridurre i disordini cognitivi e i sintomi della demenza associati a malfunzionamento della trasmissione colinergica non si può non considerare la molteplicità di sottotipi recettoriali colinergici nicotinici e muscarinici. A differenza dei nicotinici, che sono fortemente localizzati nel SNC, i muscarinici sono distribuiti in tutto il corpo. Gli M1 sono localizzati nelle regioni corticali del SNC e quindi un potenziale target per la cura della patologia di Alzheimer e dei suoi sintomi<sup>54</sup>.

## **4.Scopo della ricerca**

Le gamma-secretasi sono enzimi appartenenti alla famiglia delle aspartil-proteasi di membrana. Ogni membro della famiglia ha ruoli di cleavage ed è costituito da diverse unità. Le secretasi hanno una funzione peculiare ed un po' specifica: esse tagliano proteine ad un solo dominio trans-membrana nei residui che si trovano all'interno del dominio stesso e cioè nella parte interna al doppio strato lipidico. Questo processo si chiama RIP o proteolisi regolata intra-membrana<sup>55-56</sup>. Ad oggi sono state identificate una cinquantina di substrati della gamma-secretasi, oltre all'APP. Tra questi abbiamo: Notch, Jagged e la Nectina-1 alfa<sup>57</sup>. Il taglio attivato dal RIP innesca un

meccanismo di traslocazione dei risultanti domini intracellulari (ICDs) verso il nucleo, rivestendo essi una funzione di signalling. Il RIP è essenziale nell'attività delle cellule ed è responsabile della maturazione stessa delle cellule.

Il complesso delle gamma-secretasi consiste di quattro proteine principali: Aph-1, Pen-2, PSEN e Nct. Aph sta per anterior pharynx-defective, Pen sta presenilina-enhancer- protein, PSEN per presenilina e Nct per Nicastrina<sup>58</sup>. La presenilina ha nove passaggi trans membrana, Aph-1 sette e Pen-2 due. Nct è una glicoproteina di membrana di tipo 1 con un dominio nel lume molto grande e il suo ecto-dominio è responsabile della maturazione del complesso enzimatico. La complessità della struttura è evidente e non ancora definita nei dettagli trattandosi di un complesso a 19 domini trans membrana<sup>59</sup>.

Gli inibitori della gamma-secretasi sono classificabili in tre categorie in funzione del punto in cui essi interagiscono con il complesso: (i) inibitori al sito attivo, (ii) inibitori che agiscono al sito di docking e (iii) inibitori che agiscono su un sito alternativo. Questi ultimi possono essere divisi ulteriormente in

due classi chimiche, inibitori carbossamidici e inibitori arilsulfonamidici<sup>60</sup>.

Gli inibitori di prima generazione hanno mostrato effetti collaterali non accettabili, dovuti molto probabilmente all'inibizione del processing di Notch da parte della gamma-secretasi. Ciò interferisce con la naturale maturazione di linfociti B e T, con conseguente tossicità a livello del tratto gastrointestinale e una accresciuta sensibilità alle infezioni<sup>61-62</sup>.

Negli ultimi anni sono stati identificati molti inibitori GS (gamma-secretasi) oralmente biodisponibili in grado di abbassare la produzione di beta-amiloide, sia nel cervello umano, che di topo, e alcuni di questi sono in fase clinica<sup>63-64</sup>. Il Semagacestat, LY-450139, è arrivato in fase III<sup>65</sup>. Non ha apprezzabile selettività verso l'inibizione Notch e quindi una finestra terapeutica molto ristretta tra abbassamento della produzione di beta-amiloide e gli effetti collaterali. In effetti, la Eli Lilly ha da poco annunciato di avere bloccato lo sviluppo dei trial del Semagacestat, avendo chiari risultati di declino cognitivo, evidente rispetto ai soggetti che assumevano

placebo. In più, è stato osservato un aumentato rischio di cancro alla pelle, attribuibile al processing del Notch<sup>66</sup>. I risultati negativi potrebbero essere attribuibili (a) ad un effetto rebound, che provoca una over-produzione di proteina beta-amiloide oppure (b) l'inibizione della gamma-secretasi provoca una inibizione del processing, non solo di APP ma anche di altre substrati rilevanti ai processi cognitivi. Il signalling Notch, per esempio, è stato collegato a processi di formazione della memoria a lungo termine<sup>67-68-69</sup>.

Composti più selettivi di ultima generazione hanno cercato di risolvere tali problemi, aumentando la selettività verso APP rispetto ad altri substrati e in special modo verso Notch. Il primo composto ad arrivare ai trial clinici è stato BMS-708,163. Il meccanismo di azione non è chiaro e altrettanto dicasi per il suo profilo con ridotti effetti collaterali. Tuttavia gli ostacoli alla comprensione su come ottenere selettività

$A\beta_{1-42}$  rispetto ad  $A\beta_{1-40}$ , al Notch e ad altri substrati hanno ridotto le ricerche di nuovi composti<sup>66</sup>.



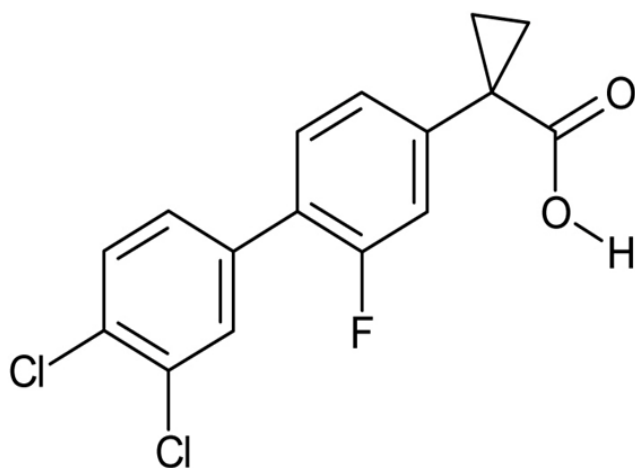
Più recentemente, in fatti, si è sviluppata la ricerca di modulatori della gamma-secretasi, piuttosto che di inibitori. Per modulatore si intende una molecola in grado di variare la proporzione delle isoforme di beta-amiloide, mantenendo la velocità di processing dell'APP. La I° generazione nacque dall'osservazione che soggetti che assumevano FANS regolarmente erano meno esposti al rischio di sviluppare AD. Si è infatti scoperto che un gruppo di FANS quali l'indometacina, il sulindac, l'ibuprofene e il flurbiprofene erano capaci di modulare la produzione di peptidi beta-amiloidei, sia in vitro che in vivo<sup>70-71</sup>. In particolare, veniva ridotta selettivamente la produzione di  $A\beta_{1-42}$ , mentre aumentava  $A\beta_{1-38}$ , senza cambiare significativamente quella di  $A\beta_{1-40}$ .

Sono attualmente una ottantina i brevetti pendenti.

Due ipotesi sono sul tappeto. La prima ipotesi suggerisce l'interazione diretta dei FANS con l'enzima gamma-secretasi e in particolare con la presenilina allostericamente, con conseguente cambio di conformazione dell'enzima e con conseguente alterazione del cleavage. In tal caso si è osservato

anche una modulazione, non una inibizione, del sito di cleavage di Notch in maniera simile in termini di quantità a quella osservata per APP. La seconda e più recente ipotesi prevede una interazione con la parte C-terminale di APP, ma non appare ancora chiara.

I modulatori sono divisi in due classi chimiche: FANS derivati da acidi carbossilici e non-FANS.



CHF5074 ovvero 1-(3',4'-dichloro-2-fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-cyclopropanecarboxylic acid è un modulatore delle  $\gamma$ -secretasi in via di sviluppo per la prevenzione e il trattamento dell'Alzheimer, sintetizzato dalla Chiesi Farmaceutici<sup>72</sup>. E' più selettivo nei confronti di  $A\beta_{1-42}$ , ma è

privo di attività inibitoria sugli enzimi COX-1 e COX-2 a concentrazioni superiori di  $100\mu\text{molL}^{-1}$  e  $300\mu\text{molL}^{-1}$  rispettivamente (Imbimbo et al., 2007b)<sup>72</sup>.

A  $5\mu\text{molL}^{-1}$  non si osservano effetti sul clivaggio intracellulare di Notch in cellule di rene embrionale umano 293 con espressione APPswe. Nei ratti, il farmaco somministrato oralmente ha un buon assorbimento (50%) e ha un tempo di dimezzamento nel plasma molto lento (Peretto et al., 2005).

In topi trasgenici Tg2576, il trattamento cronico con il farmaco riduce evidentemente i livelli di  $A\beta$  senza segni istologici di tossicità periferica mediata da Notch (Imbimbo et al., 2007a)<sup>72</sup>.

Lo scopo di questo studio è quello di investigare sui possibili effetti neuroprotettivi di questo farmaco: lo abbiamo testato su cellule differenziate neuronali e su cellule di glioblastoma SHSY-5Y trattate sia con Amyloid  $\beta$ -protein fragment 25-35 che con TRAIL.

## **5. Materiali e Metodi**

## 5.1 Composti chimici utilizzati

**Alexis Biochemicals:** Trail

**EuroClone:** Modified Eagle's Medium (MEM): Ham's F12, Trypsin 0.05% con EDTA 0.02% in PBS, Penicillin Streptomycin solution 100x, L-Glutamine solution 100x, Fetal bovine serum (FBS)

**Sigma:** Amyloid  $\beta$ -protein fragment 25-35, Acido retinoico, Dimetil sulfossido biotechnology performance certified (DMSO), Phosphate Buffered Saline 10x (PBS).

## 5.2 Colture cellulari

Le cellule di neuroblastoma umano della linea cellulare SHSY-5Y American Type Culture Collection (**Rockville, MD**), vengono mantenute in dish da 100mm x20mm, in 10 ml di terreno di coltura Modified Eagle's medium (MEM) : Ham's F12 contenente il 10%(v/v) di siero fetale bovino (FBS), inattivato per riscaldamento a 60°C per un ora, e una soluzione di penicillina-streptomina rispettivamente 100UI/ml e 100µg/ml.

Le cellule sono mantenute nell'incubatore a una temperatura di 37°C in un'atmosfera composta per il 5% da CO<sub>2</sub> e il 95% da aria. Il passaggio delle cellule viene effettuato all'incirca ogni 5/6 giorni quando sono quasi a confluenza: vengono lavate due volte con 2ml di PSB sterile, dopo aspirazione viene aggiunta la tripsina 2ml e conservate in incubatore per 5minuti. La tripsina viene inattivata per aggiunta di 2-3ml di terreno MEM/F12 al 10%FBS. Prelevo la quantità di cellule, da me decisa, dalla mia fiaschetta e la risospendo in un nuovo dish contenente 10ml di nuovo terreno. Per la differenziazione

abbiamo utilizzato l'acido retinoico a una concentrazione di  $10\mu\text{M}$ .

I neuroni ippocampali e corticali sono stati ottenuti da ratti Wistar al loro sedicesimo giorno di vita, le cellule sono state tenute in coltura per dieci giorni : le cellule sono state mantenute sia in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di  $0.5 \times 10^5$  cellule o in dish di plastica ad una concentrazione di  $5 \times 10^6$  cellule / piatto. Piastre con 96 pozzetti e i dish sono state coperte con poli-D-lisina (20 mg / ml) e le cellule sono state coltivate in MEM/F12 glucosio, contenente, 5% di siero fetale bovino disattivato, e il 5% siero di cavallo, glutammina (2 mm), penicillina (50 U / mL) e streptomicina (50 mg / ml; Invitrogen).

### **5.3 Test di vitalità (MTT test)**

Per valutare la vitalità delle SHSY-5Y è stato utilizzato il test dei Sali di tetrazolio. La piastra da 96-well con una densità cellulare di  $5 \times 10^3$  cellule per well è stata trattata con  $10\mu\text{l}$  di

MTT. Questo test è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. Ciò accade prevalentemente nei mitocondri. Dopo all'incirca 3h di incubazione a 37°C vengono aggiunti, dopo aspirazione della soluzione, 100µl di DMSO per well. La lettura con lo spettrofotometro (lettore di piastra da 96 well Microplate Autoreader, Bio-Rad model 680) è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 545e 630 nm.

#### **5.4 Risultati statistici delle analisi**

Per valutare la significatività si è utilizzato il programma NCSS2007. In particolare i risultati sono stati analizzati grazie all'ANOVA (one-way analysis of variance) e mostrati attraverso il Fisher's LSD test. La significatività è stata settata a p-value <0.05.



## **5.5 Tecniche di Western Blot**

Le proteine studiate sono state:

Trail (ABCAM).

DR5 (Alexis Biochemicals (San Diego CA,USA).

CASPASE 8 (Cell Signaling).

CASPASE 3 (Cell Signaling).

TAU (Santa Cruz Biotechnology).

p-TAU(Santa Cruz Biotechnology)

### **5.5.1 Preparazione dei lisati cellulari**

Le cellule vengono lavate con PBS per due volte e vengono staccate con 80µl per well di un cocktail di 960µl di Lysis Buffer e 40µl di inibitore delle proteasi (per 1ml). Il pelletato viene trasferito in una eppendorf da 1.5 ml. L'eppendorf viene messa sotto agitazione in una ruota per 20 minuti, e centrifugati a 4°C per 10minuti. Sul lisato cellulare così ottenuto è stato effettuato il dosaggio delle proteine con il metodo di Bradford.

I campioni sono stati mantenuti a -20°C.

Il giorno dell'esperimento, al volume del campione contenente la quantità di proteine stabilita (30 $\mu$ g), è stato aggiunto un volume equivalente di SDS loading buffer (20% glicerolo, 100nM Tris-HCl pH 6.8, 200nM dithiothreitol, 4% SDS, 0.1% blu-bromofenolo). Vengono bollite per 5 minuti e ricentrifugate.

### **5.5.2 Western Blot**

Questa metodica consente di separare proteine di diverso peso molecolare mediante la loro migrazione attraverso le maglie di un gel di poliacrilamide sotto l'azione di un campo elettrico.

I campioni, contenenti uguali quantità di proteine, vengono caricati sul gel preparati il giorno prima. Il gel di poliacrilamide è un gel dello spessore di circa 0.75 mm formato da un gradiente discontinuo di due gel a pH e concentrazioni di acrilamide diversi: un gel superiore di impaccamento (stacking gel) e uno inferiore di corsa (running gel). Le concentrazioni

utilizzate vengono decise in base al peso molecolare delle proteine solitamente ho utilizzato gel tra l'8 e il 12%.

Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa (Amersham Italia, Milan, Italy) è stato effettuato in un apposito blottatore.

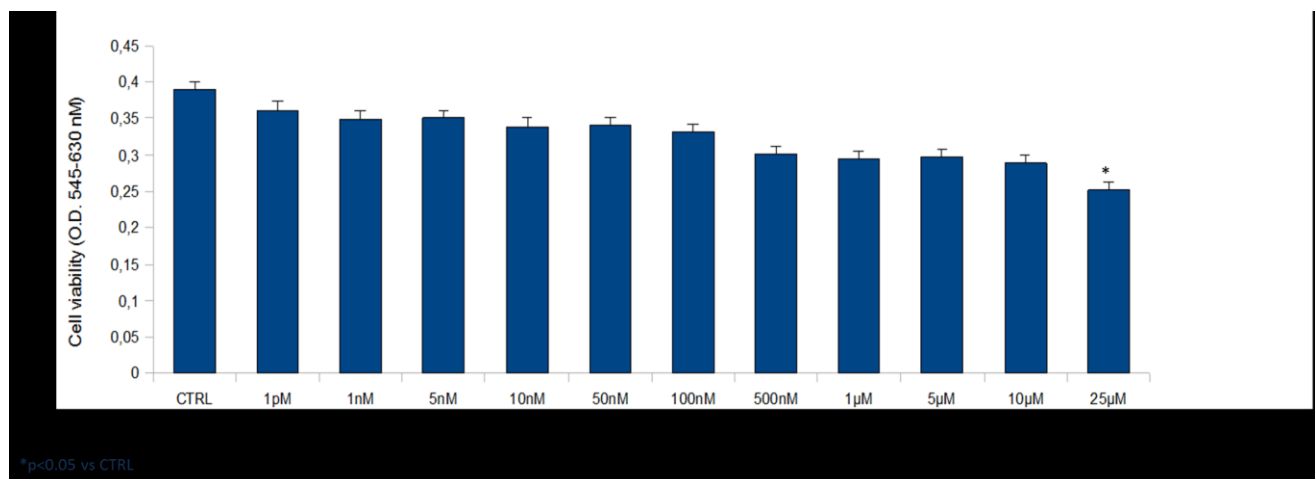
Le membrane sono state tagliate in base alle corse delle proteine e sono state incubate nella soluzione di blocco (2.5g di latte scremato in polvere e 48ml di PBST ) per un ora. Dopodichè si procede all'incubazione dell'anticorpo primario overnight.

Il giorno dopo si procede a 2 lavaggi con PBST per 10 minuti ciascuno e a 1 lavaggio da 5 minuti, dopo si incuba con il rispettivo anticorpo secondario: rabbit, mouse, goat per un'ora.

Le membrane vengono sviluppate grazie al liquido chemiluminescente. (ECL; Amersham Italia, Milano).

## **6. Risultati**

## 6.1 EFFETTI DI VITALITA' CELLULARE DEL CHF5074 SU CELLULE DI NEUROBLASTOMA UMANO SHSY-5H.

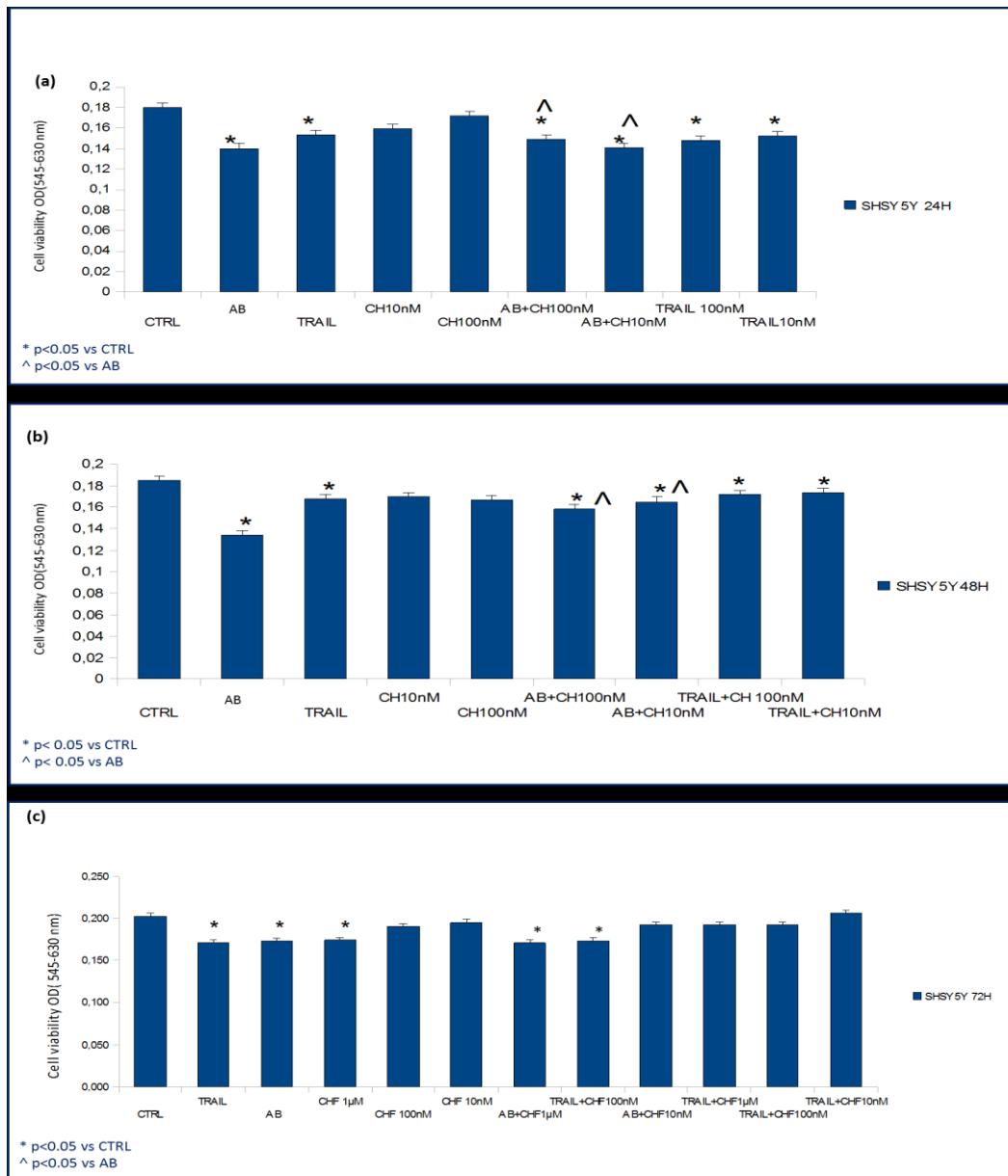


Effetto Concentrazione-dipendente (range: 1pM-25µM) del CHF5074 su cellule SHSY-5Y DOPO 72h di

Trattamento. L'asse verticale e' in media + SE; \* <0,05 vs Controllo. I dati vengono analizzati grazie

all'ANOVA (one-way analysis of variance) e mostrati attraverso il Fisher's LSD test).

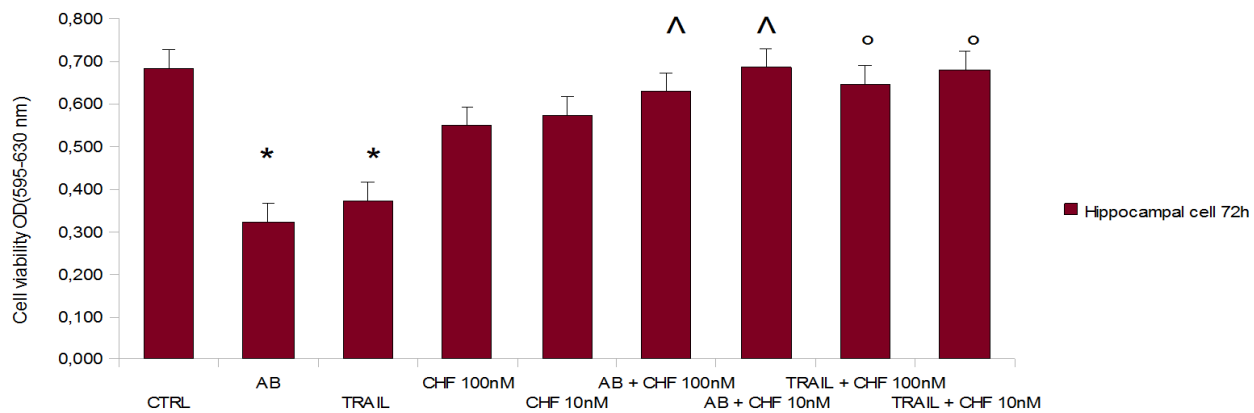
## 6.2 CHF5074 PROTEGGE LE CELLULE SH-SY5Y DALLA MORTE CELLULARE MEDIATA DA $\beta$ -AMILOIDE E TRAIL.



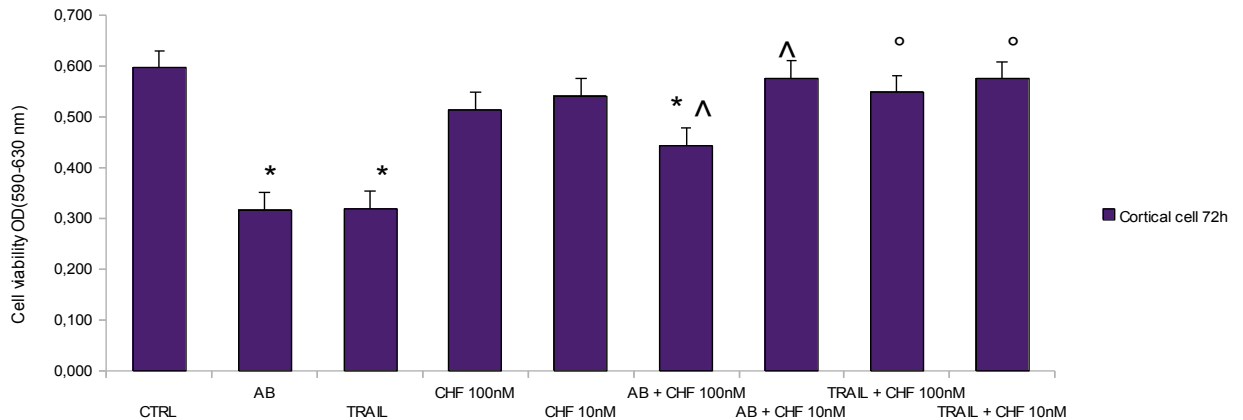
Effetti tempo-dipendenti del CHF5074 sulle cellule SH-SY5Y. Le cellule sono state pretrattate per 1h con CHF5074 (10nm o 100nm) e trattate per 24 ore (a) 48h (b) e 72h (c) con AB 25mM o TRAIL 100ng/ml. L'asse verticale è in media + SE; \*<0.05 vs. controllo. I dati vengono analizzati grazie all'ANOVA (one-way analysis of variance) e mostrati attraverso il Fisher's LSD test).

## 6.3 CHF5074 PROTEGGE I NEURONI CORTICALI E IPPOCAMPALI DEGLI EMBRIONI DI RATTO DALLA MORTE CELLULARE MEDIATA DA $\beta$ -AMILOIDE E TRAIL.

(a)

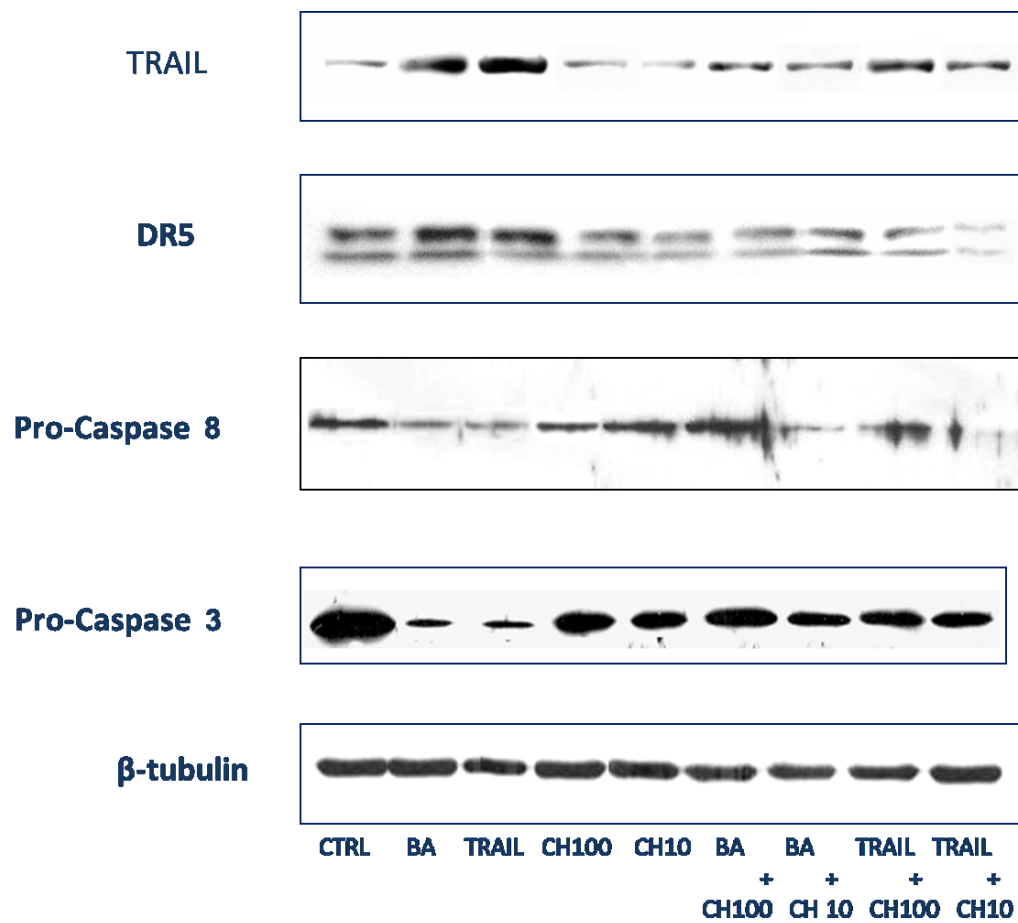


(b)



Effetti del CHF5074 su neuroni corticali e ippocampali. (a) vitalità cellulare dei neuroni ippocampali dopo 72h di trattamento con AB 25 mM, e TRAIL 100ng/ml, CHF5074 100nM, CHF5074 10nM, e le varie combinazioni con il farmaco (rispettivamente: AB+CH100nM, AB+CH10nM, TRAIL+CHF100nM; TRAIL+CHF10nM). Le cellule sono state pretrattate con il CHF per un'ora, prima del trattamento. L'asse verticale è in media + SE; \* $<0.05$  vs. controllo. I dati vengono analizzati grazie all'ANOVA (one-way analysis of variance) e mostrati attraverso il Fisher's LSD test). (b) vitalità cellulare dei neuroni corticali dopo 72h di trattamento con AB 25 mM, e TRAIL 100ng/ml, CHF5074 100nM, CHF5074 10nM, e le varie combinazioni con il farmaco (rispettivamente: AB+CH100nM, AB+CH10nM, TRAIL+CHF100nM; TRAIL+CHF10nM). Le cellule sono state pretrattate con il CHF per un'ora, prima del trattamento. L'asse verticale è in media + SE; \* $<0.05$  vs. controllo. I dati vengono analizzati grazie all'ANOVA (one-way analysis of variance) e mostrati attraverso il Fisher's LSD test).

## 6.4 CHF5074 MODULA : TRAIL DEATH PATHWAY

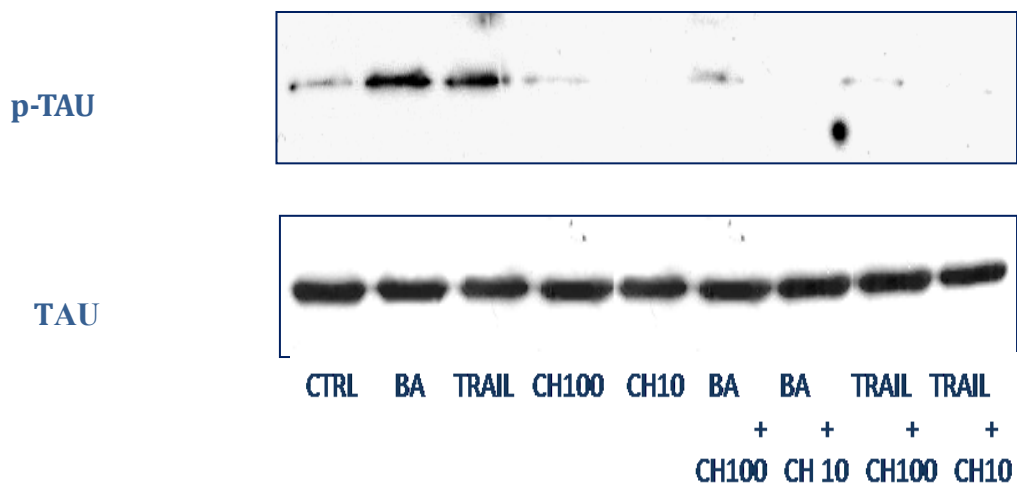


Analisi di TRAIL, DR5, Pro-Caspase8, Pro-Caspase3 and  $\beta$ -tubulina. Il Wester blot è stato effettuato utilizzando proteine estratte dalle cellule SH-SY5Y trattate con AB25-35 (2,5 $\mu$ M) o TRAIL (100ng/ml) CHF5074 (100nM), CHF5074 (10nM).

Combinazioni:rispettivamente:AB+CH100nM,AB+CH10nM, TRAIL+CHF100nM;TRAIL+CHF10nM) per 72h.



## 6.5 CHF5074 INIBISCE LA FOSFORILAZIONE DI TAU



Analisi di p-Tau e Tau. Il Western blot è stato effettuato sulle proteine estratte dalle cellule SH-SY5Y trattate con AB25-35 (2,5 $\mu$ M) o TRAIL (100ng/ml) CHF5074 (100nM), CHF5074 (10nM) e con le Combinazioni: AB+CH100nM,AB+CH10nM,TRAIL+CHF100nM;TRAIL+CHF10nM) per 72h.

## 7. Discussione

I risultati di questa tesi possono essere così riassunti:

- Il CHF5074 non ha evidenziato effetti intrinseci sulla proliferazione cellulare e/o sulla sopravvivenza.
- La preincubazione di un'ora con il farmaco si è dimostrata efficace nel proteggere le cellule dalla morte apoptotica indotta da Trail e A $\beta$ , a tutte le concentrazioni utilizzate.
- Le cellule incubate sia con Trail che con DR5 hanno mostrato: a) le cellule trattate solo con A $\beta$  e solo con Trail un aumento dell'espressione sia di Trail intracellulare che di DR5. (b) le cellule pretrattate con il farmaco: una attenuazione dell'espressione sia di Trail che di DR5.
- Attivazione di entrambe le Caspasi (8,3) nelle cellule trattate con A $\beta$  e Trail. Una attenuata espressione della forma clivata nelle cellule pretrattate dal farmaco.
- L'aumentata iperfosforilazione che si verifica in seguito al trattamento con Trail e A $\beta$  è stata significativamente inibita in presenza del farmaco a concentrazioni farmacologiche.

In conclusione questi dati preliminari supportano l'ipotesi che il CHF5074 possiede attività neuroprotettiva. E' possibile che tale

attività possa non essere esclusiva del meccanismo inibitorio delle  $\gamma$ -secretasi, ma si riferisca probabilmente a un meccanismo alternativo di protezione, con particolare attenzione riguardo le proprietà antinfiammatori/antiapoptotiche.

Per queste ragioni il CHF5074 potrebbe essere visto come potenziale candidato per il trattamento dell'Alzheimer.

## **8.Bibliografia**

- (1) Erkijuntit T, Ostbye T, Steenhuis R, Hachinski V the effect of different diagnostic criteria on the prevalence of dementia. *NEJM*, 1997, 337(23):1667-1674.
- (2) Lund and Manchester Groups Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1994, 57:416:418.
- (3) Invecchiamento cerebrale e demenze Luigi Rovizza Masson.
- (4) Hendrie H, Epidemiology of Dementia and Alzheimer's disease *Am J Geriatr Psychiatry*, 1998, 6:S3-S18.
- (5) Mckeith G, Drachma D, Folstein M et al Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative).
- (6) Disorders Association Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease *Neuron*, 1984, **34: 939:944**.
- (7) Ella Bossey-Wetzel, Robert Schwarzenbacher e Stuart A Lipton *Review Nature Medicine* July 2004.
- (8) Peter T. Lansbury e Hilal A. Lashuel *Nature* vol.443 19 October 2006 **doi:10.1038/nature05290**.
- (9) Giampaolo Merlini, M.D., and Vittorio Bellotti, M.D., Ph.D. *N. Engl J MED* 349;6 August 7,2003.
- (10) Saraiva MJ. *Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. FEBS Lett* 2001; **498:201-3**.
- (11) Christopher A Ross e Michelle A Poirier *Protein aggregation and neurodegenerative disease* July 2004; **doi:10.1038/nm1066**.
- (12) Michael T.Lin e M.Flint Beal *Nature* Vol 443 October 2006 **doi:10.1038/nature 05292**.
- (13) Calabrese V., Lodi R., Tonon C., D'Ageto V., Sapienza M., Scapagnini G., Mangiameli A., Parisi G., Stella A.,

- Butterfield D., 2005 “Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in friedreich’s ataxia”. *Journal of the Neurological Sciences*, Vol 233, n 1-2: **145-162**.
- (14) Bray, T.M.,1999 “Antioxidants and oxidative stress in health and disease: induction” *Proc.soc.Exp. Biol.Med.*, Vol 222.195.
- (15) Alison Abbott “A problem for our age” *Nature* Vol. 475 July 2011.
- (16) Robert L. Nussbaum, M.D., and Christopher E. Ellis, Ph.D. *Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease*.
- (17) Henry W. Querfurth, M.D., Ph.D., and Frank M. La Ferla, Ph.D. *Alzheimer’s Disease The New England Journal of Medicine* **362;4** January 28,210.
- (18) Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw *Biologia cellulare* Elsevier Masson.
- (19) Lund and Manchester Groups *Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia* 1994 **57:416-418**
- (20) Hardy J. and Selkoe DE, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*, *Science*. 2002 Jul 19;**297(5580):353-6**
- (21) Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A and Ashkenazi A (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand a new member of the tumor necrosis factor receptor family. *J Biol Chem* **271:12687-12690**.
- (22) Pan G, O’Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J and Dixit VM (1997). The receptor for the cytotoxic ligand Trail. *Science* **276:111-113**.
- (23) Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JCL and Lynch DH (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* **5:157-163**.
- (24) Degli-Esposti M, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, Dubose RF, Goodwin RG and Smith CA (1997). Cloning and characterization of Trail-r3, a novel

- member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* **186:1165-1170**.
- (25) Masters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P and Ashkenazi A (1997). A novel receptor for APO2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* **7:1003-1006**.
- (26) Emery JG, McDonnell P, Burke MC, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC and Young PR (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* **273:14363-14367**.
- (27) Bodmer JL, Holler N, Rymaszewski S, et al (2000). Trail receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* **2:241-243**.
- (28) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with receptor. *EMBO J* **14:5579-5588**.
- (29) Mark P. Mattson Apoptosis in Neurodegenerative Disorders *Nature Reviews* October 2000 volume 1.
- (30) Dale E. Bredesen, Rammohan V. Rao e Patrick Mehlen Cell death in the nervous system *Nature* volume 443 October 2006 **doi:10.1038/nature 05293**.
- (31) Cantarella G, Uberti D, Carsana T, Lombardo G, Bernardi R, Memo M (2003). Neutralization of Trail death pathway protects human neuronal cell line from  $\beta$ -amyloid toxicity. *Cell Death Differ* **10:134-141**.
- (32) Selkoe, D.J. Alzheimer's disease : Genes, proteins and therapy. *Physiol.Rev.*, 2001,81,741-766.
- (33) Soreq, H. ; Seidman, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old act *Nature Rev.Neurosci.*, 2001,2, 294-302.
- (34) Klafki, H. W.; Staufenbiel,M.; Kornhuber, J.; Wiltfang, J. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain*, 2006, 129, 2840-2855.
- (35) Holden, M.; Kelly, C. Use of cholinesterase inhibitors in dementia. *Adva Psychiat.Treat.*, 2002,8,89-96.



- (36) Selkoe, D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 2002, 298,789-791.
- (37) Kim, J.; Lee, K. W. Naturally occurring phytochemicals for prevention of Alzheimer's disease *J.Neurochem*, 2010,112,1415-1430.
- (38) Greig, N.H.; Utsuki, T.; Ingram, D.K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Q.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; Chen, D.; Furukawa, Sambamurti, K.; Brossi, A; Lahiri, D.K. Selective butyrylcholinester inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning: lowers Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide in rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005,102,17213-17218.
- (39) Vellom, D.C.; Radic, Z.; Li, Y.; Pickeing, N.A.; Camp, S; Taylor, Amino acid residues controlling acetylcholinesterase butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 1993,32,12-17.
- (40) Camps, P.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Gomez, T.; Munzo-Torrero, Scarpellini, M.; Viayana, E.; Badia, A.; Clos, M. V.; Camins, A.; Pallas,; Bartolini, M.; Mancini, F; Andrisano, V; Estelrich, J.; Lizondo, M.; Bid Chanal, A.; Luque , F.J. Novel donezepil-based inhibitors of acetyl-butrylcholinesterase and acetyl cholisterase-induced  $\beta$  amyloid aggregation. *J.Med.Chem.*, 2008,51,3588-3598.
- (41) Geertsas, H; Guillaumatb, P.; Granthamc, C.; Bodec, W.; Anciaux, Sachakd, S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamina and donazepil in rats, mice , and rabbits. *Brain Res.*, 2005,1033,186-1939.
- (42) Suh, W.H.; Suslick, K.S.; Suh, Y.H. Therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, 2005,5,259-269.
- (43) Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V.  $\beta$ -amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: Inhibition study *Biochem. Pharmacol.*, 2003,65,407-416.
- (44) Schrattenholz, A; Pereira, E.F.; Roth, U.; Weber, K.H.; Albuquerque X.; Maelicke, A. Agonist responses of

- neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically active ligand *Mol. Pharmacol.*, 1996,49,1-6.
- (45) Coyle, J.; Kershaw, P. Galantamine, the cholinesterase inhibitor that allosterically modulated nicotinic receptors. *Biol. Psychiat.*, 2001, 49, 289-299.
- (46) Gemma, S.; Gabellieri, E.; Huleatt, P.; Fattorusso, C.; Borriello, M.; Catalanottl, B.; Butini, S.; Angelis, M.D.; Novellino, E.; Nacci, V.; Belinskaya, T.; Saxena, A.; Campiani, G. Discovery of huperzine A-tacrine hybrids as potent inhibitors of human cholinesterases targeting their midgeorge recognition sites. *J.Med.Chem.*, 2006,49,3421-3425.
- (47) Li,J.; Wu, H.M; Zhou, R.L; Liu, G.J.; Dong, B. R. Huperzine A for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst.Rev.*, 2005, 2, 1-36.
- (48) Tang, L.; Wang,R.; Tang, X. Effects of huperzine A on secretion of nerve growth factor in cultured rat cortical astrocytes and neurite outgrowth in rat PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin.*, 2005,6,673-678.
- (49) Watkins, P.B.; Zimmerman, H.J.; Knapp, M.J.; Gracon, S.I.; Lewis, K.W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*, 1994, 271,992-998.
- (50) Villabos, A; Blake, J.F; Biggers, C.K.; Butler, T.W.; Chapin,D.S.; Chen,Y.L.; Ives,J.L.; Jones, S.B. Liston,D.R.; Nagel, A.A.; Nason,D.M.; et all. Novel benzisoxazole derivates as potent and selective inhibitors of acetylcholinesterase. *J.Med. Chem.*, 1994,37,2721-2734.
- (51) Lichtenthaler, S.F.; Haass, C. Amyloid at the cutting edge: Activation of alfa secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer's disease mouse model. *J.Clin.Investing.*, 2004,113, 1384-1387.
- (52) Pang, Y.; Quiram, P.; Jelacic,T.; Hong,F.; Brimijoin, S. Hightly potent, selective, and low cost bisb-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase, *J. Biol.Chem.*, 1996,271, 23646-23649.

- (53) Rodriguez-Franco, M.I.; Fernandez-Bachiller M.I.; Perez, C.; Hernanedez-Ledesma,B.; Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and anti-oxidant properties. *J.Med.Chem.*, 2006, 49, 459-462.
- (54) T.Mohamed and P.P.N.Rao Alzheimer's Disease: Emerging Trends in Small Molecule Therapis. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18, 4299-4320.
- (55) Steiner, H.; Fluhrer, R.; Haass,C. Intramembrana proteolysis by  $\gamma$ -secretase. *J.Biol.Chem.*2008,283,29627-29631.
- (56) Wolfe, M.S. Intramembrana proteolysis. *Chem.Rev.*2009,109,1599-1612.
- (57) Lleo, A. Activity of gamma-secretase on substrates other than APP. *Curr.Top.Med.Chem.*2008,8,9-16.
- (58) Selkoe,D.J.; Wolfe,M.S. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell.* 2007,131,215-221.
- (59) Li,H.; Wolfe,M.S.; Selkoe, D.J. Toward structural elucidation of the gamma-secretase complex. *Structure* 2009,17,326-334.
- (60) Wolfe, M.S. Gamma-secretase inhibition and modulation for Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*2008,5,158-164.
- (61) Searfoss, G.H.; Jordan,W.H; Calligaro,D.O; Galbreath, E.J.et all. Adipsin a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional gamma-secretase inhibitor. *J.Biol.Chem.*2003,278,46107-46116.
- (62) Wu, W.-L.; gamma-secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug.Dev.Res.*2009.70,94-100.
- (63) Bateman, R.J.A gamma secretase inhibitor decreases amyloid beta production in the central nervous system. *Ann.Neurol.*2009,70,94-100.
- (64) Abramowski, D. Dynamics of Abeta turnover and deposition in different beta-amyloid precursorprotein transgenic mouse models following gamma-secretase inhibition. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*2008,327,411-424.
- (65) Semagacestat.<http://en.wikipedia.org/wiki/Semagacestat>

- (66) Panelos,J.; Massi,D. Emerging role of Notch signaling in epidermal differentiation and skin cancer. *Cancer Biol Ther* 2009,8,1986-1993.
- (67) Lanz,T.A.; Hosley,J.D.; Adams W.J. et all.; Studies of Abeta pharmacodynamics in the brain, cerebrospinal fluid and plasma in young Tg2576 mice using the gamma secretase inhibitor. *J. Pharmacol.Exp.Ther.*2004,309,49-55.
- (68) Michener,M.S.; Holahan,M.A.; Gilberto,D.B. et all.; Nonhuman primate model for prediction of human Abeta effects.*Alzheimer's Dementia* 2006,2,S252,Abstract P2-069.
- (69) Costa R.M.; Drew, C.; Silvia,A.J.; Notch to remember. *Trends Neurosci.*2005,28,429-435.
- (70) Weggen,S.; Eriksen,J.L. ; Das,P.; et all. A subset of NSAID<sub>s</sub> lower amyloidogenic A $\beta$ <sub>1-42</sub> independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 2001,414,212-216.
- (71) Eriksen,J.L.; Sagi,S.A.; Smith, T.E. et all. NSAID<sub>s</sub> and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower A $\beta$ <sub>1-42</sub> in vivo. *J.Chem.Invest.* 2003, 112, 440-449.
- (72) BP Imbimbo, b Hutter-Paier, G Villetti, F Facchinetti, V Cenacchi, R Volta, A Lanzillotta, M Pizzi and M Windisch. CHF5074, a novel  $\gamma$ -secretase modulator, attenatues brain  $\beta$ -amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *British Journal Pharmacology* (2009),156,982-993.

## Ringraziamenti.

Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Renato Bernardini per i preziosi insegnamenti durante questi tre anni di Dottorato.

Inoltre, ringrazio la Dott. Giuseppina Cantarella, sempre disponibile a dirimere i miei dubbi ed ad aiutarmi nel mio lavoro.

Ringrazio la mia Tutor la Dott. Rosa Chillemi per la sua estrema disponibilità.

Intendo poi ringraziare la Chiesi Farmaceutica.

Inoltre, vorrei esprimere la mia sincera gratitudine alla Dott. Giulia Di Benedetto per i numerosi consigli durante la ricerca.

Ringrazio anche i miei colleghi: la Dott.Nadine Landolina che oltre ad essere un'amica è anche una perfetta "coinquilina" di stanza Dipartimentale e il Dott. Mimmo Scollo per i suoi contributi Informatici-Scientifici.

E, Infine, ho desiderio di ringraziare con affetto i miei genitori, mio fratello e il mio fidanzato Alessandro, per il sostegno ed il grande aiuto che mi hanno dato nella vita.