



DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE DELLA TERRA E DELL'AMBIENTE  
*Curriculum Biologia ambientale e Biotecnologie*  
XXXIV Ciclo

*Coordinatore: Prof.ssa Agata Di Stefano*

---

Valentina Sturiale

**La riattivazione del ciclo cellulare e  
il ruolo della proteina tau nucleolare nell'avvio  
della neurodegenerazione**

Tesi di Dottorato

*Tutor: Prof. Salvatore Saccone*  
*Co-tutor: Prof.ssa Concetta Federico*

---

AA.AA 2018/19 - 2020/21

# Indice

Premessa e scopo del lavoro .....	4
Abstract.....	5
Abstract – <i>English version</i> .....	7
Introduzione.....	8
Il ciclo cellulare .....	8
Regolazione del ciclo cellulare.....	10
Cicline di tipo D .....	11
Cicline di tipo E.....	11
Cicline di tipo A .....	12
Cicline di tipo B.....	13
PCNA.....	14
Il differenziamento neuronale.....	15
La neurodegenerazione.....	17
Le malattie neurodegenerative.....	19
La malattia di Alzheimer e le altre taupatie.....	19
L’ipotesi del ciclo cellulare .....	21
Il nucleolo .....	24
Struttura nucleolare.....	24
Dinamiche nucleolari.....	25
Biogenesi dei ribosomi e altri ruoli non canonici.....	25
Marcatori nucleolari .....	26
Materiali e Metodi .....	27
Colture cellulari .....	27
SH-SY5Y.....	27

Trattamenti.....	28
Estrazione dell'RNA.....	30
Quantificazione dell'RNA.....	31
Retrotrascrizione.....	32
Real Time PCR.....	34
Analisi dello splicing.....	37
Immunofluorescenza indiretta (IFI).....	38
Risultati e Discussione.....	40
Neurodegenerazione e alterazione del ciclo cellulare .....	41
Il differenziamento neuronale <i>in vitro</i> .....	43
Le cellule SH-SY5Y .....	43
Analisi dello splicing del gene <i>MAPT</i> .....	46
Il blocco del ciclo cellulare indotto da Act-D.....	51
Localizzazione di Tau-1 e AT8 .....	51
Analisi dell'espressione delle cicline .....	54
Alterazione del ciclo cellulare in cellule differenziate .....	55
Trattamento con staurosporina .....	55
Trattamento con forskolina.....	57
Trattamento con anilina .....	60
Blocco della riattivazione del ciclo cellulare.....	63
Trattamento con forskolina e PACAP .....	63
Trattamento con anilina e PACAP .....	65
Conclusioni.....	66
Bibliografia.....	70

## Premessa e scopo del lavoro

Nella presente tesi di dottorato sono descritti gli studi svolti nel triennio 2018-2021 presso il laboratorio di Genetica e Citogenetica molecolare della Sezione di Biologia Animale “*M. La Greca*” del Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali dell’Università di Catania. Il lavoro svolto è stato guidato dal prof. S. Saccone e della prof.ssa C. Federico, responsabili del laboratorio di ricerca sopra citato.

Le attività eseguite hanno avuto come obiettivo l’identificazione dei meccanismi molecolari coinvolti nella neurodegenerazione cellulare tipica della malattia di Alzheimer e di mettere a punto un sistema cellulare *in vitro* per poter valutare l’azione neuroprotettiva di specifiche molecole. Tale obiettivo è stato perseguito utilizzando cellule di neuroblastoma che possono essere indotte a differenziare in cellule di tipo neuronale. In tali cellule è possibile analizzare i cambiamenti strutturali e funzionali del nucleolo associati ad alcune isoforme di tau a localizzazione nucleare e valutare le variazioni del ciclo cellulare in condizioni fisiologiche e patologiche, per comprendere come tali modifiche possano essere coinvolte in processi quali la proliferazione, il differenziamento, la risposta allo stress e la morte cellulare. Sono stati presi in considerazione marcatori nucleolari non ancora adeguatamente caratterizzati nei processi molecolari che regolano il ciclo cellulare, tra cui la proteina tau a localizzazione nucleolare e sue isoforme specifiche. Ciò è stato fatto per provare a comprendere il ruolo delle variazioni del nucleolo e del ciclo cellulare nei cambiamenti associati alla morte cellulare osservabili nella neurodegenerazione. Infatti, molte patologie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la corea di Hungtinton e la sclerosi laterale amiotrofica sono spesso correlate all’invecchiamento dell’individuo ed hanno suscitato un interesse sempre crescente negli ultimi decenni a causa del progressivo e costante aumento dell’età media della popolazione mondiale.

Riuscire a comprendere quali processi molecolari possono riflettere modifiche nella struttura nucleolare e nella regolazione del ciclo cellulare, in modo da utilizzarli come marcatori, potrebbe costituire un passo importante per la prevenzione, per la diagnosi precoce e per la messa a punto di terapie in grado di contrastare la degenerazione cellulare che, inevitabilmente, si verifica nel corso dell’invecchiamento.

## Abstract

Negli ultimi decenni si è verificato un incremento dell'interesse della comunità scientifica riguardo alle alterazioni cellulari legate all'invecchiamento, a causa del progressivo aumento dell'età media della popolazione mondiale. Tali patologie, tra cui la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica e le altre taupatie sono correlate a variazioni qualitative e quantitative delle isoforme della proteina tau a localizzazione nucleare e nucleolare.

La presente tesi di dottorato descrive le ricerche effettuate con la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, le cui cellule sottoposte a stimolazione con acido retinoico differenziano in cellule simil-neuronali adulte e che per effetto di specifiche sostanze possono andare incontro a neurodegenerazione con un meccanismo che include il tentativo di riavvio del ciclo cellulare. Infatti, l'“ipotesi del ciclo cellulare” afferma che il processo neurodegenerativo, che si attiva nella malattia di Alzheimer e in altre patologie neurodegenerative, si verifica a causa di disfunzioni metaboliche che determinano il rientro in fase G1 in cellule ormai adulte, le quali escono dalla fase di quiescenza e iniziano un processo di proliferazione, che risulterà essere abortiva, cioè non viene completato e quindi culmina con la morte della cellula stessa. Per analizzare tale andamento sono state studiate isoforme della proteina tau (Tau-1, AT8) con diverso stato di fosforilazione, la cui localizzazione intracellulare sembra essere specifica nelle diverse condizioni cellulari: proliferative, differenziate, indotte verso la degenerazione.

L'analisi delle variazioni del ciclo cellulare è stata effettuata osservando l'espressione delle cicline (*CCND1*, *CCNE1*, *CCNA2*, *CCNB1*) fondamentali per il passaggio tra le diverse fasi del ciclo. Si è messo a punto un sistema di neurodegenerazione *in vitro*, utilizzando le cellule SH-SY5Y replicative paragonabili ai neuroblasti immaturi, differenziate in modo da mimare i neuroni adulti e trattate con specifiche sostanze per innescare il riavvio del ciclo. L'utilizzo della staurosporina nota per essere un attivatore dell'apoptosi, della forskolina quale induttore della PKA e dell'iperfosforilazione di tau nel sito AT8 (S202/T205), oppure dell'anilina, induttore dello stress ossidativo, ha permesso di analizzare la progressione del ciclo dopo aver

turbato l'omeostasi cellulare. Un traguardo fondamentale consiste, infatti, nel riconoscimento non solo delle molecole che innescano la degenerazione neuronale, ma anche nella comprensione dei meccanismi che permettono di contrastarla prima che il processo di morte cellulare venga attivato.

Per valutare la possibilità di bloccare il processo neurodegenerativo indotto dall'avvio improvviso e imprevisto del ciclo cellulare in cellule differenziate è stato utilizzato il peptide PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide*), noto in letteratura per le sue funzioni neurotrofiche e neuroprotettive. In tal modo si è cercato di capire se l'azione di tale molecola sia in grado di bloccare l'attivazione aberrante del ciclo prima dell'innescamento del processo di morte cellulare. I risultati ottenuti con il PACAP hanno mostrato un duplice effetto, in base alla molecola induttrice utilizzata (forskolina o anilina), indicando le diverse potenzialità di tale molecola. La messa a punto di un sistema *in vitro* che consente di bloccare la degenerazione neuronale e il fatto che tale blocco possa essere indotto da molecole naturali prodotte dal nostro stesso organismo sarebbe sicuramente una svolta importante nella cura di quelle patologie correlate all'invecchiamento che hanno un grande impatto sulla popolazione umana e sul servizio sanitario nazionale.

**Abstract** – *English version*

In the last decades aging disorders drew the interest of the scientific community, due to the gradual increase of average age of the World's population. Pathologies such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and other tauopathies are linked to qualitative and quantitative variations of tau protein's isoforms with nuclear and nucleolar localization.

This thesis describes the research on neuroblastoma cell line SH-SY5Y, that after retinoic acid stimulation differentiate in adult neuronal-like cells and can degenerate by specific compounds induction in a cell cycle restarting-dependent way. The "cell cycle hypothesis" proposes that neurodegeneration in AD and similar pathologies occurs cause to metabolic dysfunctions that bring the resting neurons to re-enter in G1 and start an abortive proliferation that ends with cell death. Tau isoforms (Tau-1, AT8) with different phosphorylation state and specific localization in replicative, differentiated, or degenerative conditions were used to investigate this mechanism.

Variations of cell cycle were analyzed by evaluation of cyclins expression (*CCND1*, *CCNE1*, *CCNA2*, *CCNB1*), setting up an *in vitro* neurodegeneration system with replicative SH-SY5Y comparable to neuroblasts, and differentiated SH-SY5Y like adult neurons, also treated with specific compounds to induce cell cycle reactivation. The disruption of cellular homeostasis is possibly through stimulation by staurosporine as apoptosis trigger, forskolin already known as PKA activator and tau hyperphosphorylation inductor in AT8 site (S202/T205) and aniline, known for its oxidative properties. The recognition of molecules that trigger neurodegeneration and the understanding of strategies to prevent the cell death activation are indeed important goals.

To evaluate the possibility to stop neurodegeneration after a sudden and unexpected cell cycle reactivation was used PACAP peptide (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide*), already known for its neurotrophic and neuroprotective properties. It showed a double effect depending on the inductor compound used, revealing the forskolin and aniline potential. The development of an *in vitro* system able to stop neurons degeneration and the possibility of natural and human-derived molecules to induce this stop would be an important turning point in the treatment of age-related pathologies that have a significant impact on human population and national health service.

## Introduzione

### Il ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è un processo complesso e finemente regolato che coinvolge la funzione di numerose proteine e che, dopo una serie di eventi, porta alla mitosi con formazione di due cellule figlie. Esso è implicato sia nella crescita e nella proliferazione cellulare, sia nello sviluppo dell'organismo ma anche nella risposta allo stress e alle patologie (**Schafer, 1998**). Può essere schematizzato in quattro fasi principali: la fase "gap" 1 (G1), la fase di duplicazione del DNA (S), la fase "gap" 2 (G2) e, infine, la divisione mitotica (M). In base al proprio destino, la cellula può procedere attraverso tutti gli step elencati e dare origine a due cellule figlie geneticamente identiche alla cellula madre, oppure può entrare in una condizione di quiescenza, definita fase G0, e non dividersi più (**Liu et al., 2019**). Allo stesso modo, le cellule in G0 possono continuare a persistere nel loro stato quiescente oppure possono riprendere il ciclo di divisione. L'entrata in fase G0, con la conseguente interruzione della proliferazione, dipende dalla presenza di specifici segnali anti-mitogenici oppure dall'assenza di segnali che innescano la mitosi. Affinché il ciclo cellulare proceda in modo corretto, sono presenti dei "checkpoints" che garantiscono che la cellula continui con lo step successivo solo dopo aver completato adeguatamente quello precedente e, in particolare, in fase G1 il superamento del "punto di non ritorno" definito *restriction point* (R) garantisce che la cellula sia definitivamente programmata verso la divisione e tutt'ora viene utilizzato per distinguere la fase G1 precoce e quella tardiva (**Malumbres and Barbacid, 2001**). In condizioni normali la cellula riceve numerosi segnali, anche extra-cellulari, che possono predisporla alla proliferazione e quindi al superamento del punto R, in alternativa possono bloccarla e di conseguenza si verificherà l'uscita dal ciclo cellulare e l'inizio della fase G0, ovvero uno stato di differenziamento post-mitotico. In particolari condizioni il superamento del punto R non garantisce comunque che la divisione avvenga con successo, ma il processo di divisione potrebbe essere interrotto a causa di eventi imprevisti, come danni al DNA o drastici stress metabolici (**Planas-Silva and Weinberg, 1997**).

Per garantire una corretta divisione mitotica e un trasferimento completo dell'informazione genetica la cellula deve infatti monitorare che la fase S sia stata

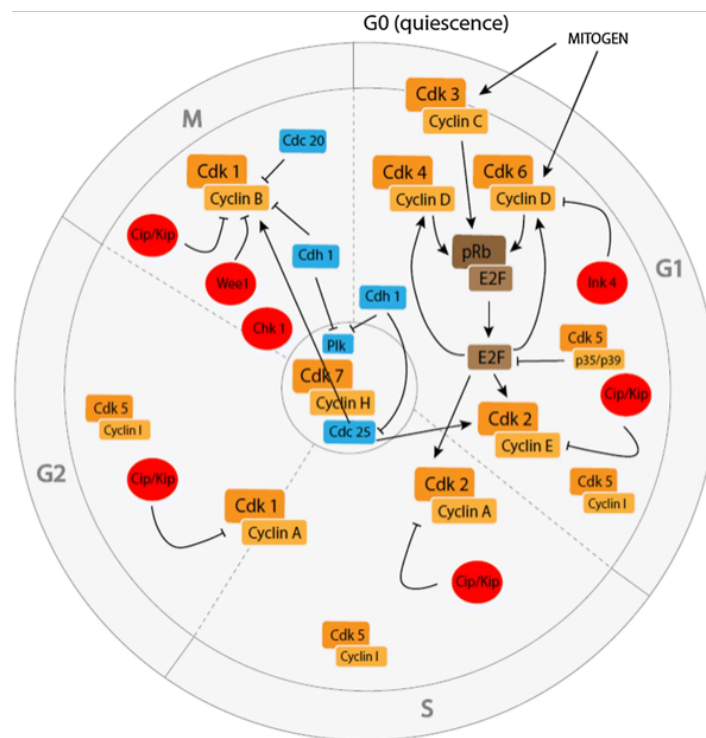


completata correttamente e deve coordinare i successivi eventi. È stato proposto un sistema checkpoint per il monitoraggio della transizione S/G2, tuttavia non sono ancora del tutto noti i processi e le molecole che intervengono in questa regolazione. È noto che determinate molecole, tra cui cicline, chinasi e fattori di trascrizione alla fine della fase S interagiscono tra loro innescando *pathways* regolativi che determinano la prosecuzione del ciclo con la fase G2 (**Saldivar et al., 2018**).

Il controllo della divisione cellulare è attribuito soprattutto a due classi di molecole, le cicline e le chinasi cicline-dipendenti (CDKs) che a loro volta sono delle serina/treonina protein-chinasi. Infatti, per poter espletare l'attività enzimatica, ciascuna CDK necessita dell'associazione della propria subunità catalitica con la subunità regolativa fornita in modo specifico da diverse cicline. Ciò è reso possibile dalla sintesi e dalla degradazione delle varie cicline in specifici momenti del ciclo cellulare, così da garantire una regolazione della divisione della cellula in modo tempo-dipendente (**Satyanarayana and Kaldis, 2009; Malumbres, 2014**).

## Regolazione del ciclo cellulare

La regolazione del ciclo cellulare è stata descritta per la prima volta nel 1982, dopo la scoperta di una proteina che si accumulava continuamente e che improvvisamente scompariva durante la divisione della cellula. Tale proteina “oscillante”, chiamata ciclina, serviva infatti per l’attivazione delle chinasi cicline-dipendenti affinché potesse avvenire l’ingresso in mitosi (**Jackson, 2008**). È stato precedentemente dimostrato che nel genoma umano sono presenti circa 20 geni codificanti per le CDKs e 30 geni codificanti per le cicline. La famiglia delle CDKs nell’uomo può essere suddivisa in 8 principali sottofamiglie: CDK7, CDK20, CDK8, CDK9, CDK10/11, CDK1/2/3, CDK4/6 e CDK5, ciascuna delle quali forma complessi proteici chinasi-ciclina, coinvolti in specifiche fasi del ciclo cellulare (**Fig. 1**) o in specifici tipi di cellule. Studi sulla regolazione del ciclo cellulare, condotti su *D. melanogaster*, *C. elegans*, *X. laevis* e *H. sapiens*, hanno infatti dimostrato che in fase G1 intervengono gli eterodimeri CDK4/6-ciclina D, nelle fasi S e G2 intervengono CDK2 e le cicline A ed E e nella fase M intervengono CDK1 e la ciclina B (**Cao et al., 2014**).



**Figura 1.** Componenti che intervengono nella regolazione del ciclo cellulare. CDKs (arancione) legano le rispettive cicline (giallo) e permettono la proliferazione tramite fosforilazione/rilascio dei fattori pRb/E2F. La regolazione è resa possibile dai CKIs (rosso) e altri regolatori (blu) (Marlier et al., 2020).

## Cicline di tipo D

Le cicline di tipo D (D1, D2 e D3), rispettivamente codificate dai geni (*CCND1*: 11q13.3, *CCND2*: 12p13.32, *CCND3*: 6p21.1), contribuiscono al controllo della fase G1 del ciclo cellulare. Esse vengono sintetizzate in risposta a segnali mitogenici extracellulari e formano differenti complessi legandosi alle chinasi CDK4 o CDK6. Tali complessi si stabilizzano e si attivano in modo da regolare la progressione della fase G1, la transizione dalla fase G1 alla fase S e, di conseguenza, l'inizio della fase di replicazione del DNA (**Sherr and Roberts, 2004**). Studi recenti hanno descritto la struttura, la funzione e la regolazione della ciclina D1, il cui livello di espressione e distribuzione subcellulare variano durante il normale avanzamento del ciclo. In particolare, l'mRNA di questa ciclina (*CCND1* mRNA) viene sintetizzato non appena uno stimolo mitogenico induce le cellule quiescenti ad entrare in fase G1. L'iniziale aumento del livello di ciclina D, che si verifica dalla fase G1 precoce fino alla fase G1 tardiva, è dovuto alla migrazione dei complessi D1/CDK4/6 nel nucleo e, solo dopo il completamento della fase S, è possibile rilevarne una diminuzione dato che la ciclina D1 viene trasportata nuovamente nel citoplasma dove si verifica la sua degradazione ad opera del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Tale meccanismo impedisce così la crescita delle cellule tumorali (**Tchakarska and Sola, 2020**). Al contrario, la de-regolazione di questo processo provoca alterazioni nello sviluppo, crescita cellulare anormale e tumorigenesi, infatti sembra essere estremamente rilevante nelle cellule cancerose e alcuni studi candidano le cicline quali potenziali oncogeni. Come evidenziato in letteratura, la ciclina D1, infatti, è over-espressa in numerosi tumori solidi, tra cui il cancro al seno, il carcinoma delle cellule squamose della testa e del collo, il cancro al pancreas, il melanoma, il cancro all'endometrio, il cancro del colon-retto e il cancro ai polmoni (**Musgrove, 2006**).

## Cicline di tipo E

La famiglia delle cicline di tipo E comprende la ciclina E1 e la ciclina E2, il cui livello di espressione varia durante il ciclo cellulare mostrando un accumulo durante la formazione e attivazione dei complessi tra le cicline E e le chinasi CDK1/CDK2, durante la transizione G1/S, e successivamente una completa degradazione alla fine della fase S. Tramite l'attività dei complessi E/CDK2 si innescano meccanismi di segnalazione cellulare, mediati da fosforilazione, che determinano a loro volta la regolazione di substrati richiesti per l'inizio e la progressione della fase S e l'espressione di numerosi

geni necessari per la replicazione del DNA (**Teixeira and Reed, 2017**). La sintesi delle cicline E avviene a partire dalla trascrizione dei geni *CCNE1* e *CCNE2*, che si attivano durante la fase G1 tardiva attraverso meccanismi di segnalazione che coinvolgono i fattori di trascrizione E2F e Myc. Questa attivazione trascrizionale è mediata dall'attività dei complessi ciclina D/CDK4 e ciclina D/CDK6 (**Gonnot et al., 2019**). Di conseguenza, così come le cicline di tipo D, anche quelle di tipo E si ritiene siano fondamentali in fase G1 e siano inoltre un fattore limitante per la progressione di questa fase del ciclo cellulare (**Sherr and Roberts, 2004**). Entrambe le cicline E sono ridondanti, ma sembrano avere pattern di espressione differenti con funzioni cellulo-specifiche. Precedenti studi hanno individuato la ciclina E1 quale regolatore del pathway del soppressore tumorale del retinoblastoma (RB), la cui inattivazione sembra dipendere proprio dalla fosforilazione attuata dai complessi ciclina E1/chinasi. RB normalmente inibisce fattori di trascrizione che regolano geni implicati nella transizione G1/S, pertanto la de-regolazione di RB da come risultato una proliferazione incontrollata che è un tipico sintomo del cancro (**Kanska et al., 2016**).

È noto che le cicline di tipo E possono svolgere altre funzioni oltre a quella convenzionale di regolazione del ciclo cellulare. Ad esempio, sembrerebbe che il complesso ciclina E-CDK2 possa inibire l'apoptosi agendo sul fattore FOXO1, che in seguito a fosforilazione e traslocazione dal nucleo verso il citoplasma, non è più in grado di promuovere la trascrizione dei geni target pro-apoptotici. Tuttavia, i processi in cui sembrerebbe essere coinvolto il complesso ciclina E-CDK2 sono molteplici e tra questi sono annoverati anche la duplicazione dei centrosomi, la regolazione di eventi epigenetici e la biosintesi degli istoni (**Siu et al., 2012**).

## **Cicline di tipo A**

Nei mammiferi sono presenti due tipi di cicline A, chiamate A1 e A2. La prima è espressa soltanto nella meiosi, nei primi stadi embrionali e in alcune cellule tumorali, invece, la seconda è espressa in tutte le cellule somatiche proliferative. Esse sono considerate delle "cicline mitotiche" ed è noto che la mancanza della ciclina A in fase G2 previene l'inizio della mitosi, tuttavia il loro ruolo durante questa fase del ciclo cellulare rimane ad oggi non pienamente compreso (**Fung and Poon, 2005; Hégarat et al., 2020**). Le cicline di tipo A iniziano ad essere prodotte verso la fine della fase G1, continuano ad accumularsi in fase G2, diminuiscono all'inizio della prometafase e, infine, spariscono

completamente in metafase. In molti organismi, comunque, la ciclina A viene degradata poco prima rispetto alla ciclina B, che a sua volta viene totalmente eliminata nella transizione metafase/anafase. Il meccanismo di degradazione delle cicline A e B coinvolge una sequenza localizzata nella regione N-terminale della proteina, chiamata “destruction box” (D-box) che conferisce instabilità e funziona da target per innescare l’attivazione del sistema ubiquitina-proteasoma. Le lievi differenze nel timing di degradazione della ciclina A e B potrebbero essere influenzate da alcuni fattori: innanzitutto l’attivazione del sistema proteasomico potrebbe dipendere non solo dalla struttura intrinseca delle cicline, ma anche dall’interazione con altre proteine e, in aggiunta, potrebbe avere un ruolo anche la diversa localizzazione subcellulare (**Fung and Poon, 2005**).

### **Cicline di tipo B**

Nei mammiferi sono state identificate tre diverse cicline di tipo B (B1, B2 e B3) la cui espressione è regolata a livello trascrizionale e dipende dallo stadio del ciclo cellulare. In particolare, è noto che i trascritti delle cicline B1 e B2 raggiungono i massimi quantitativi in fase G2 (**Wasner et al., 2003**) per poi essere degradate completamente nel passaggio dalla metafase all’anafase mediante la proteolisi ubiquitino-mediata (**Brandeis et al., 1998**). I livelli delle cicline B sono stati studiati in linee cellulari di fibroblasti umani ed è stato dimostrato che la massima espressione dell’mRNA per la ciclina B2 si verifica quando le cellule si trovano in G2/M, al contrario non è stata rilevata alcuna espressione in G0 e nella transizione G1/S (**Wasner et al., 2003**). L’attività delle cicline B si svolge tramite l’associazione con la chinasi ciclina-dipendente 1 (CDK1) che porta alla formazione del fattore di promozione della maturazione (MPF) necessario per la transizione G2/M (**Gautier et al., 1990**). L’accumulo delle cicline di tipo B inizia alla fine della fase S, in contemporanea con altri fattori mitotici. Il gene che codifica per la ciclina B1 continua ad essere attivamente trascritto durante la mitosi, con il proprio promotore che mantiene una configurazione cromatinica aperta. Ciò si verifica in condizioni normali, ma al contrario se la cellula presenta danni al DNA si blocca in fase G2 e la trascrizione delle cicline B viene repressa (**Fung and Poon, 2005**). Dopo la propria sintesi, la ciclina B1 viene trasportata dal nucleo verso il citoplasma (**Takizawa and Morgan, 2000**) e durante la transizione G2/M co-localizza con i microtubuli, collocandosi in corrispondenza dei centrosomi, per poi essere nuovamente traslocata nel

nucleo durante la profase. La ciclina B2 invece risulta situata in corrispondenza dell'apparato di Golgi (**Jackman et al., 1995**). Cellule mancanti della ciclina B possono iniziare la mitosi e fosforilare numerose proteine mitotiche, ma in seguito il complesso ciclina B/CDK1 è essenziale per la fosforilazione di un gruppo di substrati di CDK1 che sono necessari per completare la divisione cellulare (**Hégarat et al., 2020**). L'importanza delle cicline di tipo B è stata studiata in topi transgenici, con delezione dei rispettivi geni, in cui si è dimostrato che l'assenza della B2 può essere colmata dalla presenza degli altri tipi di cicline ma la mancanza della B1 comporta, al contrario, la morte *in utero* del topo con la delezione genica e questo potrebbe suggerire funzioni leggermente diverse tra le varie cicline B (**Brandeis et al., 1998**).

## **PCNA**

La sigla "PCNA" indica l'antigene nucleare delle cellule proliferative, una proteina presente in tutti gli eucarioti, altamente conservata nel corso dell'evoluzione. PCNA è essenziale per la replicazione e riparazione del DNA ed è coinvolto anche nel rimodellamento della cromatina e nel controllo del ciclo cellulare. È un fattore di processività per la DNA polimerasi delle cellule eucariotiche, infatti, promuove sia il legame della polimerasi con il DNA stampo sia la sintesi del nuovo filamento. Inoltre, interagisce con gli enzimi coinvolti nell'editing del DNA e con altre proteine regolatrici tramite un dominio chiamato PCNA Interacting Protein box (PIP-box) (**González-Magaña and Blanco, 2020**).

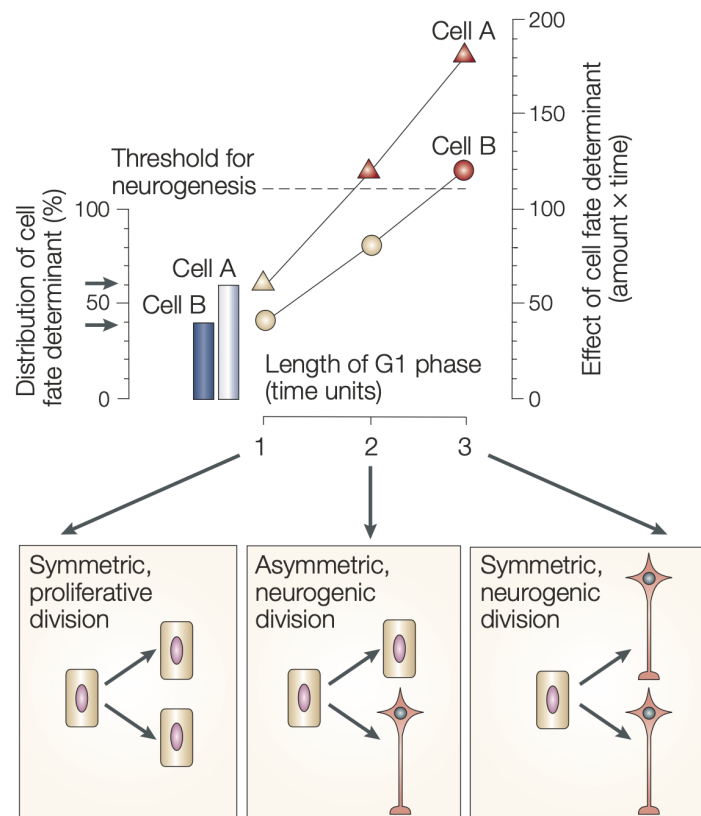
Nella regolazione del ciclo cellulare PCNA interagisce con il complesso ciclina A/CDK2 e ciò potrebbe suggerire che faccia da tramite per il legame di questa chinasi con i propri substrati (**Koundrioukoff et al., 2000**). PCNA, tuttavia, non svolge la propria attività soltanto in condizioni normali ma anche quando si verifica un problema cellulare. Nel caso di un danno al DNA oppure nell'invecchiamento, il ciclo cellulare non può procedere normalmente, pertanto vengono prodotti altri fattori, tra cui la proteina p21, che a sua volta interviene nel bloccare la transizione G1/S riducendo l'espressione di PCNA e inibendo l'attività delle chinasi cicline-dipendenti e (**Engel et al., 2003**).

## Il differenziamento neuronale

La formazione del tessuto neuronale è un meccanismo complesso che coinvolge sia la proliferazione che il differenziamento cellulare. In un primo momento avviene la replicazione massiva delle cellule progenitrici che, successivamente, andranno incontro al differenziamento e questi due processi sono bilanciati nelle varie aree del sistema nervoso centrale (SNC) per consentire la produzione dei diversi tipi neuronali e gliali (**Hardwick et al., 2015**). Affinché si verifichi la neurogenesi la cellula deve passare dalla fase G1 alla fase di quiescenza G0, pertanto è plausibile che l'over-espressione degli inibitori delle CDKs possa promuovere il differenziamento mediante inibizione della transizione tra i vari stadi del ciclo cellulare e, al contrario, un aumento dell'espressione delle cicline possa provocare l'inibizione del differenziamento (**Ohnuma et al., 2001; Ohnuma and Harris, 2003**). In tale contesto è stato dimostrato che è particolarmente rilevante la regolazione della durata della fase G1 del ciclo. Infatti, l'accumulo degli inibitori delle CDKs nelle cellule progenitrici ad ogni divisione causa un progressivo aumento della durata della fase G1 e sembrerebbe promuovere l'avvio del differenziamento. Altri esperimenti condotti *in utero* nel topo dimostrano, invece, che un aumento dell'espressione del complesso ciclina D/CDK4 determina effetti opposti: ciclo cellulare più rapido, maggiore proliferazione dei precursori e ritardo della neurogenesi (**Hindley and Philpott, 2012**).

Le cellule del SNC di tutti i mammiferi hanno origine da progenitori neuroepiteliali, localizzati nella piastra neurale durante lo sviluppo embrionale. Essi inizialmente formano un neuroepitelio pseudostratificato costituito da cellule con proprietà epiteliali, che esprimono molecole di adesione e sono altamente polarizzate. Tali progenitori sono cellule staminali neurali: possono replicarsi un numero indefinito di volte e generare cellule che poi, a loro volta, formeranno molteplici tipi cellulari. In una prima fase, le cellule neuroepiteliali proliferano e producono un tessuto pluristratificato (divisione simmetrica). Successivamente, possono andare incontro a una divisione asimmetrica, con formazione di una cellula figlia staminale e una seconda cellula che potrà essere un neurone differenziato oppure un'altra cellula non ancora differenziata, ma con potenzialità minori rispetto alla cellula di partenza. Con questo meccanismo si ottengono, dunque, le cellule gliali radiali, che possiedono sia caratteristiche neuroepiteliali che astrogliali e possono dare origine ad un numero più ristretto di

tipologie cellulari, quali gli astrociti, gli oligodendrociti e i neuroni. Anche le cellule gliali radiali possono subire una divisione simmetrica, con formazione di due cellule figlie multipotenti, o asimmetrica formando un'altra cellula gliale radiale e una seconda cellula figlia destinata a differenziarsi in uno dei tipi cellulari sopra elencati (Götz and Huttner, 2005). Dati di letteratura evidenziano come il fattore tempo sia un elemento decisivo. Si è giunti infatti alla “ipotesi della lunghezza del ciclo cellulare”, secondo la quale il rallentamento del ciclo nelle cellule neuroepiteliali può portare allo switch da cellula proliferativa a cellula neurogenica. In particolare, questa transizione verso la cellula neurogenica vera e propria sembra, almeno nel topo, essere legata all'aumento della durata del ciclo cellulare principalmente a livello della fase G1 (Fig. 2) ma non sembra interessare le restanti fasi. Nei modelli murini *in vivo* è stato visto che varie sostanze, tra cui l'olomucina, una molecola che inibisce la transizione G1/S, se usate a concentrazioni tali da rallentare senza bloccare del tutto il ciclo, possono determinare la neurogenesi prematura negli embrioni (Takahashi et al., 1995; Calegari and Huttner, 2003).



**Figura 2.** Effetto di fattori neurogenici e della durata della fase G1 del ciclo in relazione al destino cellulare. Il determinante è distribuito al 60% e 40% nelle cellule A e B rispettivamente. Né la cellula A, né la cellula B si differenziano dopo un'unità temporale; la cellula A, ma non la cellula B si differenzia dopo due unità temporali; entrambe si differenziano dopo tre unità temporali (Götz and Huttner, 2005).



## La neurodegenerazione

Il processo di degenerazione neuronale, che interessa patologie quali la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica e le taupatie in generale, dipende da meccanismi complessi in cui potrebbe essere implicata l'alterazione dell'attività nucleolare. Non è stato ancora chiarito in modo completo come cambiamenti nella regolazione della sintesi dell'rRNA possano causare l'insorgere della neurodegenerazione, ma in modelli murini è stato visto che nei progenitori neurali e nei neuroni ippocampali la perturbazione nucleolare scatena una via di segnalazione endogena con aumento del livello del fattore di trascrizione p53, che induce apoptosi rapidamente nelle cellule proliferative (progenitori neurali) e lentamente nelle cellule differenziate non attive dal punto di vista replicativo (neuroni ippocampali) (**Parlato et al., 2008**).

Per molti anni è persistita la convinzione che i neuroni differenziati fossero definitivamente bloccati nella fase G0 del ciclo cellulare. Tuttavia, a partire dagli anni '90 molti studi hanno mostrato che le proteine del ciclo cellulare possono essere over-esprese nei neuroni post-mitotici nel caso di patologie acute o degenerative a carico del SNC (**Marlier et al., 2020**). Infatti, negli ultimi decenni è aumentato l'interesse per lo studio dell'attivazione, non regolata, del ciclo cellulare nei neuroni post-mitotici. Tale fenomeno sembra poter essere correlato con la morte cellulare neuronale che si verifica in molte patologie neurodegenerative quali la malattia di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD) e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (**Demir et al., 2009**).

Nei disordini neurologici si verifica, tipicamente, l'accumulo di aggregati proteici con effetti citotossici nei confronti dei neuroni. Queste cellule vanno, quindi, incontro alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) con conseguente stress ossidativo che comporta danni al DNA e saturazione dei sistemi di riparazione. Il processo neurodegenerativo, alla fine culmina con la morte cellulare, nonostante i neuroni malati tentino di rientrare nel ciclo cellulare (**Marlier et al., 2020**).

Il danno causato dall'accumulo di ROS è correlato innanzitutto l'attivazione del complesso ciclina D/CDK4. Successivamente, i neuroni proseguono con la transizione G1/S e iniziano ad accumulare le cicline E e B1, presenti nella fase S e G2 rispettivamente. In queste condizioni, però, tali molecole, piuttosto che guidare un normale proseguimento del ciclo, sembrerebbero invece innescare meccanismi di morte

cellulare mediante l'inibizione di proteine anti-apoptiche quali Bcl-xL e l'espressione di attivatori apoptotici come BIM (**Yuan et al., 2008; Veas-Pérez de Tudela et al., 2015**).

È stato visto che i neuroni di soggetti AD tentano di rientrare in un ciclo cellulare aberrante, durante il quale sia nell'uomo che nel topo vengono espressi specifici antigeni, tra cui il marker di proliferazione Ki-67, PCNA, il complesso ciclina B/CDK1 (**Marlier et al., 2020**).

## Le malattie neurodegenerative

I disordini neurodegenerativi sono accomunati dall'accumulo di aggregati proteici extra o intra-cellulari insieme alla progressiva perdita di determinati gruppi di neuroni. Spesso ciò è associato anche alla destabilizzazione dei microtubuli con la conseguente distruzione del citoscheletro. Nelle patologie acute la morte cellulare, eventualmente indotta dal rientro nel ciclo cellulare, insorge entro alcuni minuti, al contrario nelle malattie neurodegenerative possono essere necessari anche molti anni.

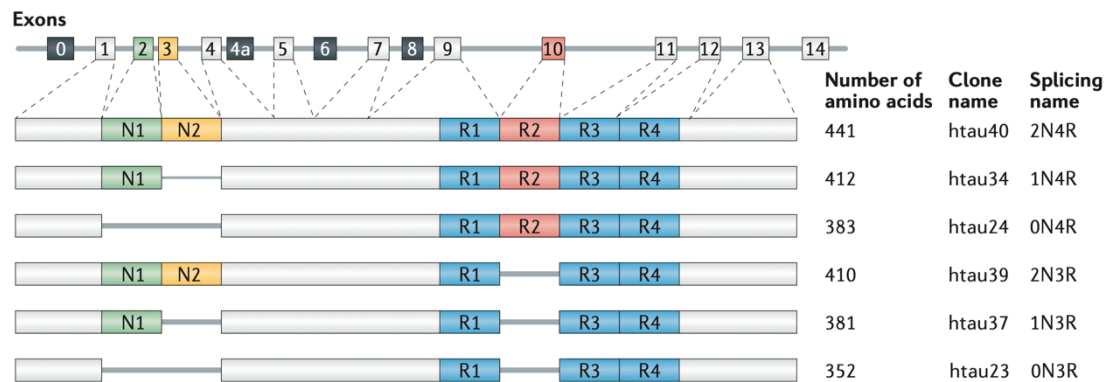
### La malattia di Alzheimer e le altre taupatie

La malattia di Alzheimer (AD) è la patologia neurodegenerativa più comune ai giorni nostri. È stata descritta per la prima volta nel 1907 da Alois Alzheimer, psichiatra e neuropatologo tedesco, dopo aver studiato i sintomi di una donna di 50 anni che soffriva di disturbi della memoria, paranoia e stato confusionale. L'autopsia eseguita post mortem ha consentito di rivelare danni istologici nel cervello che furono studiati in seguito, con un interesse sempre crescente (**Alzheimer et al., 1995**). Questa patologia neurodegenerativa è, infatti, caratterizzata dalla progressiva perdita di neuroni e da atrofia nelle aree cerebrali associate alla memoria e alle attività cognitive. A livello del tessuto cerebrale, gli individui affetti da AD presentano accumuli proteici di  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) e tau iperfosforilata, che aggregandosi formano rispettivamente le placche amiloidi extracellulari (dette anche placche senili) e i grovigli neurofibrillari intracellulari (NFTs).

L'iperfosforilazione di tau nei neuroni dei soggetti con taupatie causa la destabilizzazione dei microtubuli degli assoni, rendendoli accessibili alla degradazione enzimatica e compromettendo il network neuronale (**Demir et al., 2009**). Vari studi suggeriscono che la proteina tau abbia un ruolo centrale nello sviluppo della patogenesi dell'AD (**Bukar Maina et al., 2016**). Quando questa proteina viene iperfosforilata (P-tau) tende ad aggregarsi e precipitare formando gli NFTs e, contemporaneamente, si riduce la sua capacità di legare e stabilizzare il citoscheletro. In condizioni normali, infatti, tau è solubile ed agisce legando i microtubuli presenti nell'assone neuronale e contribuisce alla regolazione delle funzioni citoscheletriche tra cui l'assemblaggio e la stabilità microtubulare (**Kandimalla et al., 2013**).

La proteina tau appartiene alla famiglia MAPT (Microtubule Associated Protein Tau), che comprende proteine che si legano ai microtubuli. Nel cervello adulto normale

è presente in sei isoforme principali, che si originano a partire da un unico gene che va incontro a splicing alternativo dell'RNA messaggero. Nelle cellule nervose tau è localizzata negli assoni dei neuroni, ma può redistribuirsi e localizzarsi anche nel corpo cellulare e nei dendriti nel caso in cui insorgano delle taupatie (Goedert, 2004). Dal punto di vista strutturale sono presenti un dominio ammino-terminale che protrude dalla superficie dei microtubuli, una regione ricca in prolina, un dominio di legame ai microtubuli e un dominio carbossi-terminale. Lo splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 porta alla formazione di proteine con 0, 1 o 2 ripetizioni all'N-terminale (0N, 1N, 2N) e 3 o 4 ripetizioni del dominio di legame ai microtubuli (3R, 4R) e la combinazione di queste porta alle 6 isoforme canoniche della proteina (Fig. 3) (Wang and Mandelkow, 2016).



**Figura 3.** Struttura del gene *MAPT* e isoforme canoniche risultanti dallo splicing alternativo (Wang and Mandelkow, 2016).

Inoltre, tau contiene più di 80 siti che possono essere modificati post-traduzionalmente in condizioni fisiologiche tramite fosforilazione ad opera delle serina/treonina chinasi. Nel caso delle patologie neurodegenerative si verifica, invece, una fosforilazione abnorme della proteina, che culmina nella formazione dei filamenti a doppia elica (PHFs) e degli NFTs. Alcuni epitopi di tau, fosforilata e non fosforilata, sono stati rilevati nel nucleo e nel nucleolo: AT8 (pSer202/Thr205), AT100 (pThr212/Ser214) e TAU-1 (Pro189/Gly207) consentendo di ipotizzare che questa proteina possa svolgere altri ruoli oltre a quello correlato alla funzionalità citoscheletrica (Federico et al., 2018; Federico et al., 2021; Gil et al., 2017).

Dati di letteratura riportati in un lavoro che aveva l'obiettivo di studiare la relazione tra neurogenesi, ciclo cellulare e morte neuronale nei topi transgenici portatori

di mutazioni della proteina tau umana, hanno evidenziato l'aumento dell'espressione delle cicline D1 e B1 in neuroni murini utilizzati come sistema modello per l'AD. Questo studio indica, inoltre, che il rientro nel ciclo cellulare coincide con l'iperfosforilazione di tau e precede la morte cellulare, anche se il complesso meccanismo di controllo di tale processo necessita di ulteriori studi (**Schindowski et al., 2008**). Il neurone è un tipo cellulare altamente specializzato, con una ben precisa polarità, pertanto il rientro nel ciclo comporterebbe importanti modifiche strutturali, ad esempio a carico del citoscheletro. Ciò causerebbe un ulteriore stress alla cellula e, pertanto, si può ipotizzare che l'attivazione del ciclo cellulare nei neuroni maturi sia aberrante ed inneschi l'attivazione di processi che porteranno alla neurodegenerazione. Attualmente, non è del tutto chiaro cosa accade ai neuroni maturi che rientrano nel ciclo cellulare e non riescono a completare la mitosi orientandosi quindi verso la morte cellulare, ma l'ipotesi più accreditata correla tale esito negativo con alterazioni del citoscheletro (**Demir et al., 2009**).

### **L'ipotesi del ciclo cellulare**

Studi condotti utilizzando sostanze mitogeniche su colture primarie neuronali adulte hanno evidenziato un aumento dell'espressione di proteine del ciclo cellulare come le cicline e le chinasi cicline-dipendenti, che sembrerebbero indicare un tentativo abortivo di ripresa del ciclo in tali cellule differenziate. La fine della fase di quiescenza G0 è caratterizzata dalla crescita dei livelli delle cicline di tipo D, tipiche dello stadio G1. Il completamento della fase S è invece associato all'attivazione del complesso ciclina A/CDK2 e, infine, l'aumento dell'espressione della ciclina B segna che il neurone ha raggiunto la transizione G2/M. Sembrerebbe che i neuroni che rientrano nel ciclo possano avere due differenti destini: alcune cellule possono bloccarsi in fase G2 e mostrare i caratteristici markers patologici dell'Alzheimer, altre vanno incontro a morte cellulare (**Majd et al., 2008**).

Con "ipotesi del ciclo cellulare" si intende quindi supporre che la ripresa di tale evento nei neuroni maturi possa essere l'innescò di patologie neurodegenerative come l'AD. Generalmente, infatti, le cellule cerebrali permangono nel loro stato di quiescenza uscendo definitivamente dal ciclo e ciò viene confermato, ad esempio, anche nei tumori del cervello in cui la proliferazione interessa gli astrociti e gli oligodendrociti ma non i neuroni (**Liu and Zong, 2012**). Il fatto che un neurone adulto cominci nuovamente il processo che porterà alla sua divisione è quindi un evento inconsueto e ciò potrebbe porre

le basi per ipotizzare l'attivazione di un meccanismo di degenerazione più esteso che potrebbe culminare con una patologia.

In generale è stato visto che, dopo la ripresa del ciclo, l'ultima fase possibile prima della morte cellulare è la G2. Di solito, condizioni stressanti quali la presenza di ROS, la presenza di fattori citotossici o l'assenza di fattori neurotrofici possono comportare l'uscita dalla condizione G0 e la prosecuzione verso la fase S, ma nella maggior parte dei casi la cellula abortisce prima di completare la replicazione del DNA. Tuttavia, questo tipo di ciclo cellulare aberrante non è ancora stato chiarito (**Majd et al., 2019**).

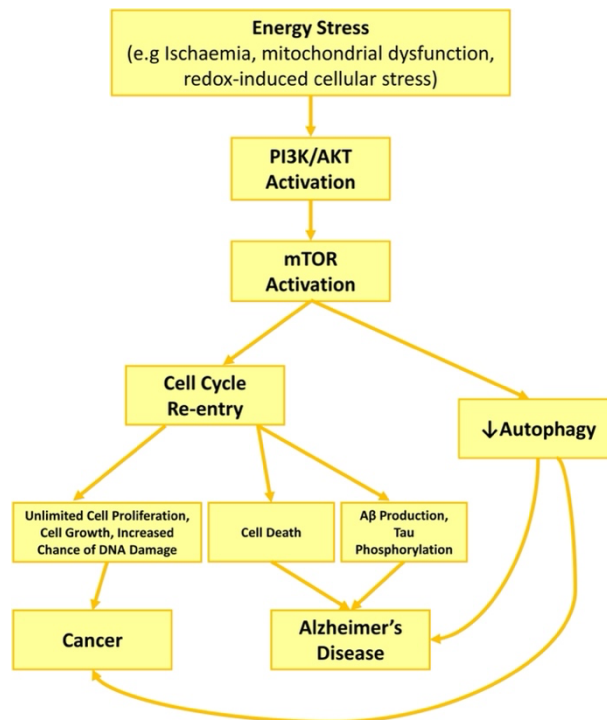
Una possibile spiegazione dell'incapacità neuronale di de-differenziarsi e completare il ciclo può essere data dalla presenza della DNA polimerasi  $\beta$ , che non porta a completamento la replicazione ed è frequentemente soggetta a errori. Ciò potrebbe essere confermato dal rilevamento nei cervelli AD di elevate quantità di questo enzima e di PCNA. La cellula contenente il DNA danneggiato potrebbe restare per un periodo limitato di tempo in fase G2 e, la presenza di ulteriori anomalie come gli aggregati proteici di tau potrebbero infine determinarne la morte (**Folch et al., 2012; Zhang et al., 2014**).

Considerando la condizione di quiescenza dei neuroni sembrerebbe che la malattia di Alzheimer e il cancro siano due tipi di patologie con caratteristiche, a primo impatto, opposte: il quadro clinico della prima mostra neurodegenerazione massiva e perdita di tessuto cerebrale, mentre la caratteristica predominante della seconda è l'aumento incontrollato del numero di cellule. Entrambe, tuttavia, sono associate all'invecchiamento che ne costituisce uno dei principali fattori di rischio. Studi condotti nella popolazione del Nord Italia nello scorso decennio hanno permesso di ipotizzare che l'insorgenza dell'una o dell'altra patologia possa fungere da fattore protettivo nei confronti della seconda. Tali ricerche evidenziano che il rischio di insorgenza del cancro negli individui AD si riduce del 50% e la probabilità che l'AD insorga nei soggetti già malati di cancro diminuisce del 35% (**Musicco et al., 2013**).

Pertanto, anche il cancro è una patologia in cui avvengono alterazioni del ciclo cellulare e in letteratura è stata proposta la "*Two-Hit Hypothesis*" secondo cui la proliferazione incontrollata e la degenerazione a seguito del rientro nel ciclo cellulare, non possono dipendere da un singolo meccanismo, ma sono causate necessariamente dalla combinazione di due insulti differenti: lo stress ossidativo e i segnali mitogenici aberranti. L'insorgenza di uno di questi eventi farebbe entrare la cellula in uno stato

stazionario, che può durare anni/decenni, nel quale le attività cellulari adattandosi potrebbero proseguire normalmente o essere in parte alterate, ma la cellula rimarrebbe comunque sensibile nei confronti di un secondo insulto (Zhu et al., 2007).

L'attivazione del ciclo cellulare evidenziata mediante l'attivazione delle cicline e chinasi, che avviene ripetutamente ed in modo incontrollato nel cancro e al contrario è destinata alla degenerazione nell'AD, è quindi una caratteristica comune di queste patologie. Però, dato l'esito opposto, essa potrebbe coinvolgere meccanismi molecolari differenti non ancora adeguatamente chiariti. Nell'AD e nel cancro, un possibile innesco dell'attivazione del ciclo cellulare potrebbe essere lo stress ossidativo che coinvolgerebbe il pathway di segnalazione PI3K/Akt/mTOR (Fig. 4), che a sua volta ha un importante ruolo nei processi di crescita cellulare, proliferazione e apoptosi (Majd et al., 2019).



**Figura 4.** Schema della via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR nell'attivazione del cancro e dell'AD (Majd et al., 2019).

## Il nucleolo

Il nucleolo è un compartimento sub-nucleare, non circondato da membrana, il cui ruolo principale consiste nella biogenesi delle unità ribosomiali nelle cellule eucariotiche.

### Struttura nucleolare

Nei mammiferi il nucleolo presenta tre regioni distinte in cui avvengono diverse fasi della sintesi ribosomiale:

- i centri fibrillari (FCs), che contengono una o alcune ripetizioni di DNA ribosomiale (rDNA);
- i componenti fibrillari densi (DFCs), che circondano gli FCs e nell'interfaccia tra queste due parti avviene la trascrizione dei geni ribosomiali;
- i componenti granulari (GCs), che racchiudono le unità FC/DFC e sono il sito in cui i pre-mRNAs subiscono il processo di maturazione.

I nucleoli umani sono formati da alcune dozzine di unità FC/DFC, con quantità variabili in base al tipo cellulare, e ciascuna unità contiene due o tre sequenze di DNA ribosomiale (rDNA) trascrizionalmente attive (**Lafontaine et al., 2021**).

L'rDNA è a sua volta organizzato in regioni definite NORs (organizzatori nucleolari), localizzati nel braccio corto dei cromosomi acrocentrici 13, 14, 15, 21 e 22. La posizione dei NORs nel braccio corto di tali cromosomi, tra il telomero e il centromero, li isola rispetto ai geni che sono trascritti dalle RNA polimerasi II (Pol II) e III. Nel genoma umano tali regioni sono formate da *clusters* di circa 300 sequenze ripetute in tandem dove avviene la trascrizione ad opera dell'RNA polimerasi I (RNA Pol I) e l'espressione è regolata sia da eventi epigenetici che tramite il rimodellamento della cromatina. Le regioni di rDNA codificanti sono separate da *spacers* intergenici che contengono promotori ed altri elementi regolativi (**McStay and Grummt, 2008**). Inoltre, le sequenze eterocromatiniche che fiancheggiano l'rDNA vengono indicate come *Proximal Joint* (PJ) verso il centromero e *Distal Joint* (DJ) verso il telomero (**Floutsakou et al., 2013**).



## **Dinamiche nucleolari**

Negli eucarioti superiori i nucleoli appaiono e scompaiono in base alla fase mitotica in cui si trova la cellula e la trascrizione della RNA Pol I subisce un graduale decremento fino al silenziamento completo (**Hernandez-Verdun, 2006**). Durante la divisione cellulare la sintesi dell'rRNA viene interrotta e le NORs, che sono meno condensati rispetto alla cromatina circostante, appaiono come spazi acromatici nei cromosomi metafasici marcati (**McStay, 2016**). In profase i nucleoli vengono disassemblati e la regolazione di tale processo dipende dalla repressione della trascrizione dell'rDNA, che a sua volta è regolata dal complesso ciclina B/chinasi che fosforilati specifici substrati. Al contrario, in telofase avviene l'assemblaggio delle strutture necessarie per la successiva ripresa della biosintesi dei ribosomi e, pertanto, i nucleoli appaiono nuovamente. Affinché ciò si verifichi, i fattori che erano stati inattivati mediante fosforilazione, vengono riattivati verso la fine della mitosi (**Raska et al., 2006**). Appena ricomincia la trascrizione dell'rDNA i nucleoli iniziano a formarsi attorno ai singoli NORs e appaiono dapprima come piccoli nucleoli multipli. L'avanzamento del ciclo cellulare comporta un processo di fusione nucleolare, con formazione di grandi nucleoli maturi che contengono NORs multipli (**Hernandez-Verdun, 2006**).

## **Biogenesi dei ribosomi e altri ruoli non canonici**

La sintesi dei ribosomi è un processo complesso che richiede l'intervento di oltre 200 fattori di assemblaggio, piccole ribonucleoproteine nucleolari (snoRNPs) e diversi RNA ribosomiali (rRNAs). Inizialmente si forma l'rRNA precursore policistronico 47S (pre-rRNA), che si ottiene mediante la trascrizione dell'rDNA ad opera della RNA Polimerasi I (Pol I). Tale molecola viene successivamente sottoposta a una fase di maturazione che porta alla formazione degli rRNA 28S, 18S e 5.8S che, sono processati dalle piccole ribonucleoproteine nucleolari (snoRNPs) e, infine, assemblati con le proteine ribosomiali per generare le subunità mature che vengono trasportate nel citoplasma. Il compartimento nucleolare è caratterizzato dalla presenza di circa 150 proteine, delle quali circa il 30% è coinvolto nel ruolo canonico di sintesi dei ribosomi. Il restante 70% potrebbe partecipare invece a funzioni non convenzionali del nucleolo e potrebbe avere un ruolo nel controllo dello sviluppo embrionale, nel differenziamento delle cellule staminali, nella regolazione del ciclo cellulare e nella replicazione e riparazione del DNA (**Boisvert et al., 2007**).

È noto sia che componenti tipicamente nucleolari possono avere una localizzazione differente, sia che complessi e macromolecole non-nucleolari possano invece trovarsi in questo compartimento e ciò avviene in particolari situazioni dipendenti dallo stato del ciclo cellulare, dalla crescita cellulare e dal differenziamento (**Raska et al., 2006**).

Proteine nucleolari quali la nucleolina, la nucleostemina, la nucleofosmina e la fibrillarina sono coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi e le funzioni nucleolari comprendono anche l'esportazione dell'RNA messaggero (mRNA), la biosintesi delle particelle di riconoscimento del segnale (SRP), la biosintesi di vari *small nuclear RNA* (snRNA) ed RNA transfer (tRNA), il sequestro di proteine regolatrici, il controllo del ciclo cellulare durante l'invecchiamento e in condizioni di stress (**Raska et al., 2006**). In particolare, la nucleostemina è una proteina localizzata prevalentemente nel GC del nucleolo e non sembra essere coinvolta nella sintesi dei ribosomi, ma potrebbe avere un ruolo nel controllo della proliferazione cellulare. Essa è infatti espressa maggiormente nelle cellule staminali neurali, nelle cellule staminali embrionali e in alcune linee cellulari cancerose (**Tsai and McKay, 2005**).

### **Marcatore nucleolari**

Tra i fattori associati alla cromatina nucleolare è presente UBTF (Upstream Binding Transcription Factor), che possiede siti di legame ad alta affinità localizzati immediatamente a monte del punto di inizio della trascrizione dell'rDNA e pertanto viene localizzato a livello degli FCs.

Un altro marcatore nucleolare è la fibrillarina (FBL), che interviene nel processamento precoce del pre-rRNA e marca in modo specifico i DFCs.

I GCs possono invece essere marcati con nucleofosmina e Nop52, per localizzare i siti di processamento tardivo del rRNA precursore e l'assemblaggio delle subunità ribosomiali.

## Materiali e Metodi

### Colture cellulari

Le colture cellulari immortalizzate (linee cellulari) possono essere utilizzate in forma proliferativa, in forma differenziata e in seguito a trattamenti con specifiche sostanze. Il vantaggio di tali sistemi è dovuto al fatto di poter avere a disposizione un “modello *in vitro*” che mima ciò che accade nelle cellule *in vivo* in condizioni normali o dopo esposizione a molecole che possono alterarne la morfologia e le funzioni.

#### SH-SY5Y

Nella presente tesi è stata utilizzata la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, che deriva da una biopsia di midollo osseo di un individuo femmina di 4 anni ed è un sub-clone della linea parentale SK-N-SH ottenuta nel 1970. La linea cellulare SH-SY5Y presenta, in fase replicativa, una morfologia di tipo epiteliale e, in condizioni di crescita normali, le cellule si trovano sia totalmente adese che in parziale sospensione. Sono un buon modello per lo studio dei fenomeni correlati al sistema nervoso centrale, poiché possono essere assimilate ai neuroblasti immaturi quando sono coltivate nella forma replicativa e ai neuroni maturi, quando vengono, invece, indotte al differenziamento con acido retinoico (all trans-RETINOIC ACID, Sigma Aldrich, Cat. N. R2625).

Il differenziamento consente di ottenere neuroni maturi, che possono essere utili per gli esperimenti nell’ambito della neurobiologia poiché, dato il particolare tipo di tessuto, è molto difficile poter reperire e lavorare su colture primarie.

Il differenziamento della linea SH-SY5Y si ottiene tramite l’utilizzo di diverse molecole, tra cui l’acido retinoico (RA), gli esteri del forbolo e neurotrofine specifiche come il BDNF (fattore neurotrofico derivato dal cervello). Quando queste cellule si trovano nello stato non differenziato proliferano, esprimono i markers dei neuroni immaturi e non mostrano i caratteristici prolungamenti neuronali. Dopo il differenziamento, invece, si formano dei lunghi prolungamenti, l’attività proliferativa diminuisce ed esprimono markers dei neuroni maturi come GAP-43 (growth-associated protein). Inoltre, a supporto che le SH-SY5Y differenziate costituiscono una popolazione cellulare omogenea, è stato rilevato che necessitano di fattori neurotrofici per la

sopravvivenza, così come avviene fisiologicamente nei neuroni maturi e la rimozione di BDNF dal terreno di mantenimento comporta l'insorgere di processi apoptotici (**Shipley et al., 2016**).

Protocollo per la crescita della linea SH-SY5Y:

- Crescita in monostrato nelle condizioni standard pari a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, nel terreno di crescita DMEM/F12 (con L-glutamina) addizionato con il 10% di siero fetale bovino inattivato al calore (hiFBS) e l'1% di antibiotico Penicillina/Streptomycin (P/S).
- La coltura è mantenuta con passaggi effettuati ogni 3-5 giorni, con diluizione da 1:2 a 1:5.

Protocollo per il differenziamento della linea SH-SY5Y:

- Seminare 100 000 cells/ml in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> con terreno DMEM/F12 addizionato con 10% hiFBS e 1% P/S.
- Mantenere la coltura in incubatore per 24 ore.
- 1° giorno di differenziamento: aspirare il terreno già presente nella fiasca e scartarlo, aggiungere il terreno DMEM/F12 addizionato con 2.5% hiFBS, 1% P/S e RA 10 µM.
- Porre in incubatore per 48 ore.
- 3° giorno di differenziamento: aspirare il terreno già presente nella fiasca e scartarlo, aggiungere il terreno DMEM/F12 addizionato con 1% hiFBS, 1% P/S e RA 10 µM.
- Porre in incubatore per 48 ore.
- 5° giorno di differenziamento: aspirare il terreno già presente nella fiasca e scartarlo, aggiungere il terreno DMEM/F12 addizionato con 1% hiFBS, 1% P/S e RA 10 µM.
- Porre in incubatore per 48 ore.
- 7° giorno di differenziamento: aspirare il terreno già presente nella fiasca e scartarlo, aggiungere il terreno Neurobasal addizionato con 1X B-27, BDNF 50 ng/ml, 1% P/S e RA 10 µM.
- Porre in incubatore per 48 ore.
- 9° giorno di differenziamento: utilizzare le cellule differenziate SH-SY5Y così ottenute, oppure rimuovere il terreno precedente e mantenere in coltura per ulteriori 2 giorni con Neurobasal addizionato con 1X B-27, BDNF 50 ng/ml e 1% P/S.

## Trattamenti

Sono state utilizzate specifiche sostanze, addizionate al terreno di coltura, per studiare le variazioni del ciclo cellulare neuronale in risposta a diversi stimoli in grado di

determinare alterazioni quali il blocco della trascrizione, l'iperfosforilazione di tau, la produzione di ROS e l'induzione della morte cellulare.

In particolare, sono state utilizzate l'Actinomicina-D (Act-D), un agente intercalante del DNA che interferisce con l'RNA polimerasi I, la forskolina (FK) che agisce da induttore dell'iperfosforilazione della proteina tau a livello dell'epitopo AT8 (Wang et al., 2018), l'anilina che determina la produzione di ROS e quindi lo stress ossidativo nel neurone (Makhdoumi et al., 2019) e la staurosporina (STS) quale induttore di apoptosi (Schultheiss et al., 2012).

Protocollo trattamento con Actinomicina-D:

- Aggiungere la sostanza (concentrazione 0.05 µg/ml) direttamente al terreno delle colture cellulari replicative e porre in incubatore per 1 ora.
- Procedere con l'estrazione dell'RNA.

Protocollo trattamento con forskolina:

- Aggiungere la sostanza (concentrazione 4 µM) direttamente al terreno delle colture replicative e differenziate e porre in incubatore per 4 e 14 ore.
- Procedere con l'estrazione dell'RNA.

Protocollo trattamento con anilina:

- Aggiungere la sostanza (concentrazioni 0.1, 1, 10, 100 µg/ml) direttamente al terreno delle colture replicative e differenziate e porre in incubatore per 4, 14 e 24 ore.
- Procedere con l'estrazione dell'RNA.

Protocollo trattamento con staurosporina:

- Aggiungere la sostanza (concentrazione 300 nM) direttamente al terreno delle colture replicative e differenziate e porre in incubatore per 4 e 14 ore.
- Procedere con l'estrazione dell'RNA.

## Estrazione dell'RNA

Al fine di studiare l'espressione dei geni di interesse è stata effettuata l'estrazione dell'RNA dalle colture SH-SY5Y proliferative e differenziate, sia di controllo, cioè prive di qualsiasi sostanza aggiuntiva, che addizionate con le sostanze specifiche sopra elencate. Per effettuare tale procedura è stato utilizzato l'estrattore automatico MagCore® Compact (RBCBioscience) con l'apposito kit MagCore® Total RNA Cultured Cells Kit (Cat.No. MRC-02, RBCBioscience), specifico per l'estrazione dell'RNA totale da colture cellulari. Tale sistema sfrutta una tecnologia basata su particelle magnetiche per purificare l'RNA totale dalle cellule in coltura e il prodotto ottenuto può essere direttamente utilizzato per metodiche successive quali la sintesi del cDNA e la real time PCR.

Protocollo per l'estrazione dell'RNA automatizzata:

- Aggiungere 10 µl di β-Mercaptoetanolo in 1 ml di RB Buffer.
- Preparare 200 µl di DNase I (RNasi-free) per ciascun campione aggiungendo 10 µl di DNase I stock in 190 µl di DNase reaction buffer (1X).
- Staccare fino a  $1 \times 10^6$  cellule dalla fiasca utilizzando uno scraper, trasferire in un tubo da centrifuga e centrifugare a 1300 rpm per 8 minuti.
- Scartare il surnatante, spezzare il pellet, risospendere in PBS sterile e centrifugare a 1100 rpm per 5 minuti.
- Scartare il surnatante, spezzare il pellet e risospendere in 200 µl di β-Mercaptoetanolo + RB Buffer preparato precedentemente.
- Trasferire nel *Sample Tube*.
- Preparare il rack dell'estrattore come schematizzato nella figura sottostante e caricarlo nello strumento.
- Avviare il programma 610, selezionando l'opzione di rimozione del DNA genomico.
- Attendere il completamento dell'estrazione, circa 75 minuti, e conservare gli RNA estratti a -80°C o procedere con il loro utilizzo.

## Quantificazione dell'RNA

Per misurare la quantità di RNA estratto è stato utilizzato il fluorimetro Qubit 4 (ThermoFisher Scientific) con lo specifico kit Qubit RNA HS Assay (Cat.No. Q32852, ThermoFisher Scientific). Questo strumento quantifica la concentrazione dell'RNA presente nel campione sfruttando un colorante fluorescente che emette un segnale solo quando si lega al target, minimizzando così l'effetto di possibili contaminanti che creerebbero rumore di fondo. La misurazione con Qubit è molto sensibile, infatti consente di valutare anche basse concentrazioni RNA, inoltre è più accurata rispetto alla misurazione dell'assorbanza nel campo UV, che rileva tutto ciò che assorbe alla lunghezza d'onda di 260 nm (DNA, RNA, proteine, nucleotidi liberi o Sali). Il kit utilizzato è altamente selettivo per l'RNA e rileva concentrazioni comprese tra 250 pg/ $\mu$ l e 100 ng/ $\mu$ l, inoltre non quantifica DNA, proteine o nucleotidi liberi né altri contaminanti quali sali, solventi e detergenti.

Protocollo per la quantificazione dell'RNA:

- Preparare 200  $\mu$ l di *Qubit™ working solution* per ciascuno standard (RNA a concentrazione nota forniti dal kit) e ciascun campione diluendo il *Qubit™ reagent* in *Qubit™ buffer* 1:200.
- Preparare lo Standard 1 in una provetta da 0,5 ml aggiungendo 190  $\mu$ l di *working solution* e 10  $\mu$ l di Standard 1.
- Preparare lo Standard 2 in una provetta da 0,5 ml aggiungendo 190  $\mu$ l di *working solution* e 10  $\mu$ l di Standard 2.
- Preparare i campioni in provette da 0,5 ml aggiungendo 180-199  $\mu$ l di *working solution* e 1-20  $\mu$ l di campione.
- Vortexare per 2-3 secondi.
- Incubare le provette per 2 minuti a temperatura ambiente.
- Procedere con la lettura alo fluorimetro, inserendo prima gli Standard 1 e 2 e successivamente i campioni.

## Retrotrascrizione

L'RNA estratto è stato retrotrascritto utilizzando il kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Cat.No. 18080400, Invitrogen), che consente la produzione di cDNA a partire da 0.1 pg fino a 5 µg di RNA totale. Il kit include il mix di enzimi SuperScript™ III/RNaseOUT™, la miscela di reazione 2X First Strand e l'Annealing Buffer.

Il mix di enzimi contiene una trascrittasi inversa derivata da retrovirus, ingegnerizzata per ridurre l'attività dell'RNase H e garantire stabilità termica, e un inibitore dell'RNasi che previene la degradazione dell'RNA target dovuta alla contaminazione con ribonucleasi. La miscela di reazione 2X contiene MgCl<sub>2</sub> 10 mM e dNTPs 1 mM in un buffer ottimizzato per la sintesi del cDNA. Possono essere utilizzati primer random hexamers, primer oligo(dT) o primer gene-specifici (GSPs). I primer random non sono specifici e sono solitamente usati per guidare la sintesi a partire da mRNA ricchi in GC o per sfruttare come template tutti gli RNA presenti in un certo campione. I primer oligo(dT) sono maggiormente specifici e vengono utilizzati per ibridizzare le code poli(A) al 3', presenti nella maggior parte degli mRNA eucariotici. I primer GSPs sono invece altamente specifici e legano la sequenza di interesse nella regione prossima al 3' dell'mRNA target.

Protocollo per la retrotrascrizione:

- Preparare la seguente miscela in provette da 0.2 ml

Reagenti	Volume
Fino a 5 µg di RNA totale	<i>n</i> µl
Primers (50 µM oligo(dT) <sub>20</sub> o 50 ng/µl random o 2 µM GSPs)	1 µl
Annealing Buffer	1 µl
H <sub>2</sub> O DEPC	fino a 8 µl

- Incubare nel termociclatore a 65°C per 5 minuti, poi porre immediatamente in ghiaccio per almeno 1 minuto e spinnare.
- Aggiungere i seguenti reagenti alla miscela

Reagenti	Volume
2X First Strand Reaction Mix	10 µl
SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix	2 µl

- Vortexare brevemente e spinnare.



- Incubare per 50 minuti a 50°C se si utilizzano primer oligo(dT) o GSPs; incubare per 5-10 minuti a 25°C e poi 50 minuti a 50°C se si utilizzano primer random.
- Terminare la reazione a 85°C per 5 minuti e conservare i cDNA a -20°C o utilizzare direttamente.

## Real Time PCR

La real time PCR (o PCR quantitativa, qPCR) è una tecnica che permette di quantificare i livelli di espressione di un gene, monitorando l'amplificazione della sequenza target in tempo reale mediante la rilevazione della fluorescenza emessa dai prodotti di PCR marcati con sonde specifiche o non specifiche. In teoria la quantità di DNA raddoppia ad ogni ciclo di reazione, quindi il DNA target viene amplificato in modo esponenziale almeno durante i primi cicli, quando i reagenti sono in eccesso rispetto ai prodotti accumulati. Con la real time PCR è possibile misurare la quantità di amplificato prodotto durante ciascun ciclo di reazione, in fase esponenziale, sfruttando la fluorescenza di un substrato che lega il target nella procedura di amplificazione. Possono essere utilizzate sonde non specifiche che legano il solco minore del DNA come il SYBR Green I, ideale per numerose applicazioni, tra cui gli studi di espressione genica o sonde specifiche come le TaqMan, più adatte per studiare le variazioni alleliche. L'aumento della quantità di dsDNA durante i cicli di reazione corrisponde a un aumento del segnale fluorescente rilevato dallo strumento.

In tale metodica occorre impostare la *baseline* (linea di base), che equivale al valore a partire dal quale l'amplificato inizia ad accumularsi, il *threshold* (linea soglia), cioè il livello di fluorescenza che interseca tutte le curve nella fase esponenziale ed è sufficiente a distinguersi dal background potendo essere quindi considerato come un segnale vero e proprio. Il ciclo nel quale viene superata la soglia è definito *cycle threshold* ( $C_T$ ) (ciclo soglia) e viene utilizzato per la quantizzazione comparativa. Considerando che, in teoria, il prodotto di PCR raddoppia a ogni ciclo, la differenza tra i  $C_T$  dei diversi campioni riflette la differenza della quantità di target presente inizialmente. Il metodo più utilizzato per gli studi di espressione genica è la quantificazione relativa, in cui il livello del target è normalizzato con quello di un controllo interno. Per effettuare questa tecnica sono necessari:

- Gene target – gene d'interesse per il quale si vuole valutare l'espressione, amplificato con primer specifici.
- Calibratore – campione di riferimento per la quantificazione comparativa, in genere è un campione non trattato.
- Controllo endogeno – gene house keeping espresso in modo costitutivo in ciascun campione analizzato.

Per quantificare il segnale bisogna innanzitutto normalizzare il  $C_T$  del gene target con il  $C_T$  del gene house keeping, in modo da ottenere il  $\Delta C_T$  ( $C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ controllo}}$ ), tale valore deve essere successivamente normalizzato con il  $\Delta C_T$  del calibratore per ottenere il  $\Delta\Delta C_T$ . Infine, per calcolare la concentrazione del gene target nel campione iniziale d'interesse si applica la formula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  che consente di effettuare la quantificazione relativa (RQ) di ciascun campione dopo aver posto il valore RQ del calibratore pari a 1.

I primers utilizzati per analizzare l'espressione dei geni che codificano per le diverse cicline sono indicati nella **Tabella 1**.

**Tabella 1.** Primers utilizzati per analizzare l'espressione degli mRNA delle cicline retrotrascritti in cDNA.

Primer	Tipo	Gene	Sequenza 5'-3'	Riferimento
D1	forward	<i>CCND1</i>	GGATGCTGGAGGTCTGCGA	Yang et al., 2004
D1	reverse	<i>CCND1</i>	AGAGGCCACGAACATGCAAG	
E164	forward	<i>CCNE1</i>	GGTTCCATTTGCCATGGTTA	Sherr, 1993
E	reverse	<i>CCNE1</i>	CCCTATTTTGTTCAGACAACATGGC	
A186	forward	<i>CCNA2</i>	AGGGAAATGGAGGTTAAATG	Tessari et al., 2003
A	reverse	<i>CCNA2</i>	CACTGACATGGAAGACAGGAACCT	
B1	forward	<i>CCNB1</i>	AATGAAATTCAGGTTGTTGCAGGAG	He et al., 2017
B1	reverse	<i>CCNB1</i>	CATGGCAGTGACACCAACCAG	
PCNA	forward	<i>PCNA</i>	GGCCGAAGATAACGCGGATAC	Takashima et al., 2013
CPCNA	reverse	<i>PCNA</i>	GGCATATACGTGCAAATTCACCA	

In questo studio sono stati utilizzati i kit SensiFAST™ SYBR® & Fluorescein (Cat.No. BIO-96005, Bioline) e SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR (Cat.No. 11736-051, Invitrogen). Il primo necessita dello step iniziale di retrotrascrizione che deve essere effettuato separatamente, invece, il secondo offre un metodo semplice e veloce per quantificare il target di interesse a partire direttamente dall'RNA estratto.

Protocollo SensiFAST™ SYBR® & Fluorescein:

- Preparare la master mix (volume finale 20  $\mu$ l per ciascun campione)

Reagenti	Volume	Conc. Finale
2X SensiFAST SYBR® & Fluorescein Mix	10 $\mu$ l	1X
10 $\mu$ M Primer Forward	0.8 $\mu$ l	400 nM
10 $\mu$ M Primer Reverse	0.8 $\mu$ l	400 nM
cDNA Template	1-2 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O DEPC	Fino a 20 $\mu$ l	

- Impostare il template tramite il software

- Avviare la qPCR con il seguente *run method*: 1 ciclo a 95°C per 10 minuti (attivazione della polimerasi); 40 cicli a 95°C per 30 secondi (denaturazione) e 60°C per 30 secondi (annealing/estensione).

Protocollo SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR:

- Preparare la master mix (volume finale 20 µl per ciascun campione)

Reagenti	Volume
SuperScript® III RT/Platinum® <i>Taq</i> Mix	0.5 µl
2X SYBR® Green Reaction Mix	10 µl
10 µM Primer Forward	0.5 µl
10 µM Primer Reverse	0.5 µl
cDNA Template (1 pg – 1 µg RNA totale)	1-2 µl
H <sub>2</sub> O DEPC	Fino a 20 µl

- Impostare il template tramite il software
- Avviare la qRT-PCR con il seguente *run method*: 50°C per 3 minuti (la sintesi del cDNA può avvenire nel range 42-60°C); 95°C per 5 minuti; 40 cicli a 95°C per 15 secondi (denaturazione) e 60°C per 30 secondi (annealing/estensione).

## Analisi dello splicing

Lo studio delle diverse isoforme della proteina tau presenti nella linea cellulare SH-SY5Y, derivanti dallo splicing alternativo del gene *MAPT*, è stato effettuato a partire dai cDNA (ottenuti come indicato nei paragrafi precedenti) amplificati mediante PCR con Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (Cat.No. 10966018, Invitrogen) con il seguente *run method*: 94°C per 5 minuti; 35 cicli a 95°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 40/150 secondi (impostazione variabile in base alla lunghezza dell'amplificato atteso); 72°C per 7 minuti. I primers utilizzati sono specifici per i diversi esoni del gene *MAPT* analizzati e sono indicati nella **Tabella 2**.

Il DNA amplificato è stato analizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio addizionato con il colorante SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Cat.No. S33102, Invitrogen). I frammenti sono stati visualizzati e fotografati utilizzando il transilluminatore Safe Imager™ 2.0 Blue-Ligh (Cat.No. G6600EU, Invitrogen).

La quantificazione dell'espressione genica delle principali isoforme rilevate è stata ottenuta con real time PCR seguendo il protocollo descritto nel paragrafo precedente.

**Tabella 2.** Primers (da Federico et al., 2018) utilizzati per amplificare gli mRNA del gene *MAPT* retrotrascritti in cDNA.

Primer	Tipo	Localizzazione	Sequenza 5'-3'
F1	forward	esone 1	AACCAGGATGGCTGAGCCCC
F4	forward	esone 4	TGAAGAAGCAGGCATTGGAG
R4	reverse	esone 4	GTGACCAGCAGCTTCGTCTT
R5	reverse	esone 5	ATCGCTTCCAGTCCCGTCT
F7	forward	esone 7	CAAAGACACCACCCAGCTCT
R7	reverse	esone 7	ATCCTGGTGGCGTTGGCCTG
F9/10	forward	esone 9/10	CGGGAAGGTGCAGATAATTAA
F9/11	forward	esone 9/11	AGGCGGGAAGGTGCAAATA
R11	reverse	esone 11	TGCTCAGGTCAACTGGTTTG
R12	reverse	esone 12	CCCAATCTTCGACTGGACTC

## Immunofluorescenza indiretta (IFI)

L'immunofluorescenza è una metodica che si avvale dell'utilizzo di anticorpi marcati con fluorofori per poter rilevare antigeni specifici. Tale tecnica è "indiretta" (IFI) quando viene effettuata con un anticorpo primario, non marcato, che lega il target d'interesse e successivamente si usa un anticorpo secondario marcato che riconosce e lega una parte dell'anticorpo primario e permette così di ottenere un segnale fluorescente. L'IFI è più sensibile rispetto all'immunofluorescenza diretta (in cui si usa un unico anticorpo marcato), poiché più anticorpi secondari possono legarsi al primario per determinare un'amplificazione del segnale.

Per effettuare l'IFI le cellule sono state prima seminate su vetrino, trattate o no nelle varie condizioni dello studio, e dopo sono state fissate in paraformaldeide (pFA) per preservarne la struttura tridimensionale e non denaturare le proteine.

I vetrini sono stati, infine, osservati al microscopio confocale laser LSM700 (Zeiss) e le immagini sono state acquisite e analizzate con il software ZEN 2010.

### Reagenti:

- PBS 1X
- pFA 3% - saccarosio 4% in PBS 1X
- Glicina 10 mM in PBS 1X
- 0.5% Triton in PBS 1X
- Blocking solution 1X, diluizione 1:10 dello stock (Blocking reagent for ELISA, Roche)
- 0.2% Tween20 in PBS 1X
- Etanolo 70%, 85%, 95%
- Anticorpo primario anti-AT8 in mouse (ThermoScientific), diluizione 1:50
- Anticorpo primario anti-TAU-1 in mouse (Merck Millipore), diluizione 1:100
- Anticorpo primario anti-TAU-5 in mouse (Merck Millipore), diluizione 1:100
- Anticorpo primario anti- $\alpha$ -Tubulina in mouse (Merck Millipore), diluizione 1:100
- Anticorpo primario anti-Ki-67 in rabbit (Novusbio), diluizione 1:100
- Anticorpo primario anti-UBTF in rabbit (Novusbio), diluizione 1:50
- Anticorpo secondario anti-mouse FITC in sheep (Sigma-Aldrich), diluizione 1:100

- Anticorpo secondario anti-rabbit TRITC in goat (Sigma-Aldrich) diluizione 1:400.

Protocollo IFI:

- Lavare in PBS 1X per 5 minuti
- Fissare in pFA per 20 minuti a temperatura ambiente
- Lavare in glicina per 5 minuti (2 lavaggi)
- Permeabilizzare in Triton 0,5% a temperatura ambiente
- Incubare con 100 µl di blocking solution per 20 minuti a temperatura ambiente in camera umidificata
- Sgocciolare senza asciugare
- Incubare overnight a 37°C con 100 µl di anticorpi primari in blocking solution
- Lavare in PBS-Tween a 37°C con agitazione per 5 minuti (3 lavaggi)
- Incubare per 1 ora a 37°C con 100 µl di anticorpi secondari in blocking solution
- Lavare in PBS-Tween a 37°C con agitazione per 5 minuti (3 lavaggi)
- Deidratare in etanolo 70% - 85% - 95%, 5 minuti cadauno
- Asciugare i vetrini all'aria
- Colorare con DAPI (~ 30 µl)
- Fissare il copri oggetto con Rubber Cement.

## **Risultati e Discussione**

Il presente lavoro descrive uno studio il cui obiettivo principale comprende l'identificazione dei meccanismi molecolari coinvolti nelle fasi precoci della neurodegenerazione cellulare tipica della malattia di Alzheimer. Tale obiettivo è stato perseguito analizzando le caratteristiche del gene *MAPT* e di uno dei suoi prodotti, la proteina tau a localizzazione nucleare. Sono state utilizzate le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y che, dopo induzione con acido retinoico e differenziamento in cellule di tipo neuronale, sono state trattate con molecole (anilina, forskolina, staurosporina) che si ritiene possano indurre le cellule nervose verso la degenerazione mediante avvio del ciclo cellulare. Infine, dopo induzione del ciclo cellulare con tali molecole si sono trattate le cellule con PACAP, per valutarne l'efficacia quale neuroprotettore in questa tipologia di cellule.



## Neurodegenerazione e alterazione del ciclo cellulare

La linea cellulare SH-SY5Y, quando indotta con acido retinoico differenzia in cellule simil-neuronali, rappresentando un sistema *in vitro* di differenziamento neuronale, alternativo alle cellule staminali embrionali, utilizzabile per studi *in vitro* relativi, ad esempio, alla neurodegenerazione o ad altre patologie neuronali. Un'altra linea cellulare di neuroblastoma, la linea SK-N-BE, è già stata analizzata in tal senso ed è stato osservato che durante il differenziamento neuronale *in vitro*, la proteina tau, e in modo specifico alcune sue isoforme fosforilate, sembrano avere un ruolo importante nel processo di neurodegenerazione legato alla malattia di Alzheimer.

La linea cellulare SK-N-BE deriva dalla biopsia di midollo osseo di un individuo maschio di 2 anni, con neuroblastoma disseminato, sottoposto a cicli ripetuti di chemioterapia e radioterapia, mentre la linea cellulare SH-SY5Y è un sotto-clone (SK-N-SH > SH-SY > SH-SY5 > SH-SY5Y) di una coltura stabilizzata a partire da metastasi del midollo osseo in una femmina di 4 anni ed è caratterizzata dalla presenza di due tipi cellulari con morfologia differente, una neuroblastica e l'altra epiteliale. Le cellule di neuroblastoma tendono ad assumere le caratteristiche morfologiche e biochimiche del tumore da cui si originano, pertanto tali linee cellulari, se pur simili, possiedono differenti livelli enzimatici e di sintesi dei neurotrasmettitori. La linea SH-SY5Y ha attività dopamina- $\beta$ -idrossilasica paragonabile a quella dei gangli cervicali superiori di ratto, che è consistentemente maggiore in fase stazionaria di crescita rispetto alla fase esponenziale, invece la linea SK-N-BE ha una maggiore attività butiril-colin-esterasica (**Biedler et al., 1978**).

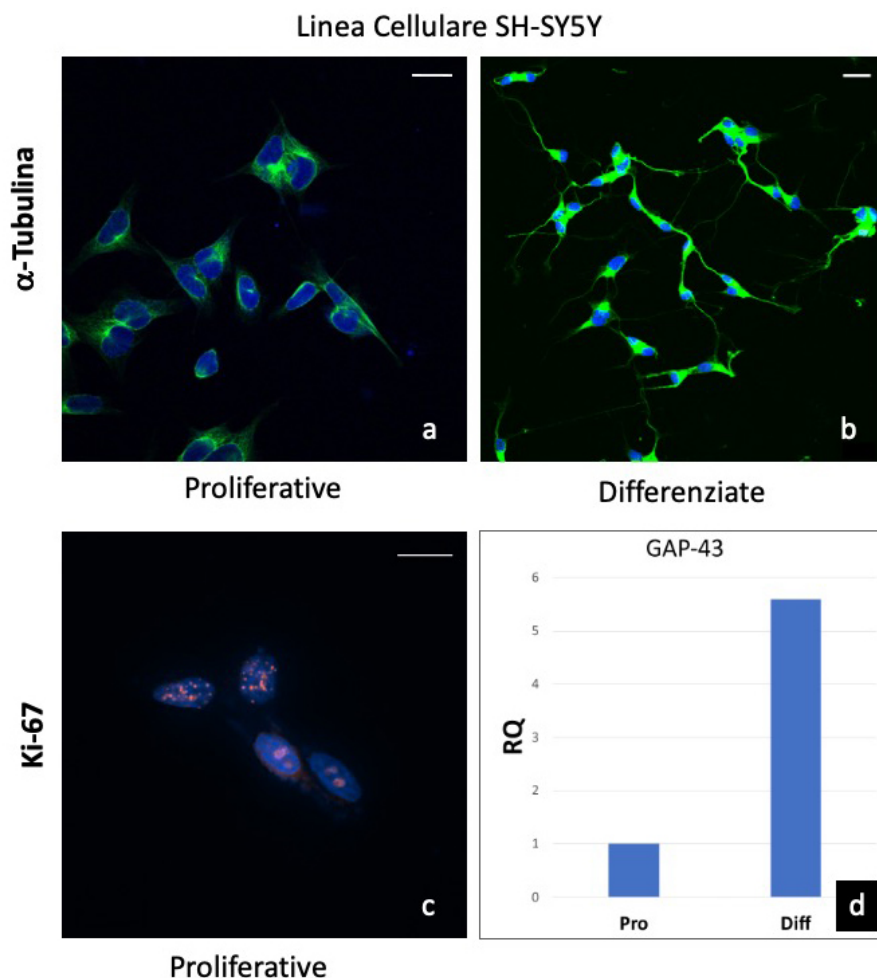
Nel "modello *in vitro*" di differenziamento neuronale rappresentato dalle cellule SH-SY5Y cresciute in presenza di acido retinoico, è possibile indurre, con specifiche molecole, alterazioni cellulari quali l'apoptosi o altre tipologie di degenerazione cellulare per identificare i meccanismi molecolari chiave del processo che possono essere bersaglio di trattamento farmacologico. Poiché è stato ipotizzato che l'avvio del processo di neurodegenerazione nella malattia di Alzheimer possa essere associato ad un imprevisto tentativo di rientro nel ciclo cellulare di neuroni differenziati, un'analisi delle modificazioni cellulari, e in particolare della cromatina nucleolare, associati alla transizione da neurone differenziato a neurone in cui viene innescato il ciclo cellulare può rappresentare un ottimo strumento per testare la validità di tale ipotesi. All'interno di tale

quadro, la proteina tau, codificata dal gene *MAPT*, sembra avere un ruolo centrale. In particolare, tra le diverse isoforme della proteina tau, quella che sembra essere maggiormente coinvolta nell'innescò del ciclo cellulare anomalo dei neuroni differenziati, è quella a localizzazione nucleolare, in parte già analizzata nelle cellule SK-N-BE.

## Il differenziamento neuronale *in vitro*

### Le cellule SH-SY5Y

Un sistema di neurodegenerazione cellulare basato sulla linea cellulare SH-SY5Y deve prima di tutto essere validato, dimostrando che per effetto dell'acido retinoico le cellule bloccano il ciclo cellulare e differenziano in cellule di tipo neuronale. La dimostrazione che le cellule analizzate siano effettivamente differenziate è stata ottenuta con l'analisi della morfologia cellulare, che abbiamo osservato mediante immunolocalizzazione dell' $\alpha$ -tubulina, che marca in modo specifico la componente

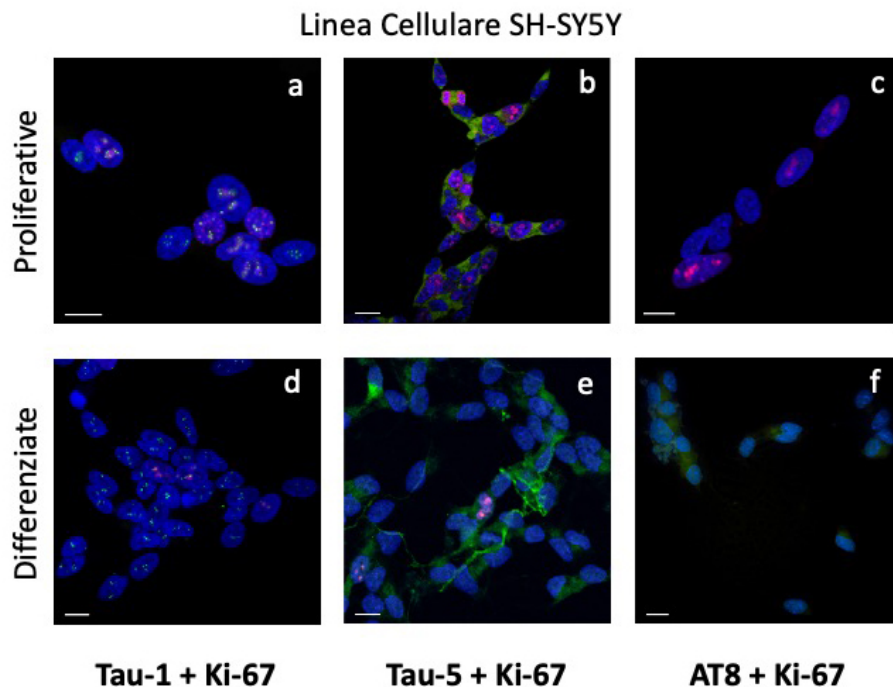


**Figura 5.** Analisi del differenziamento della linea cellulare SH-SY5Y. Localizzazione mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) dell' $\alpha$ -Tubulina (fluorescenza verde) nelle cellule replicative e differenziate (a, b). Distribuzione dell'antigene Ki-67 (fluorescenza rossa) nei nucleoli delle cellule replicative (c). I nuclei sono marcati con DAPI (fluorescenza blu). L'espressione dell'mRNA codificante per *GAP-43* è stata evidenziata mediante qRT-PCR (d). Barre di scala: a, c: 10  $\mu$ m; b: 20  $\mu$ m. RQ: quantificazione relativa ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

microtubulare del citoscheletro mettendo in evidenza i prolungamenti cellulari tipici dei neuroni differenziati (**Fig. 5 a, b**).

Inoltre, mediante immunolocalizzazione dell'antigene nucleare Ki-67, un marcatore del ciclo di divisione cellulare, assente nelle cellule differenziate, è stato evidenziato lo stato fisiologico delle singole cellule, con la presenza di Ki-67 nelle cellule SH-SY5Y replicative (**Fig. 5 c**). È stato anche rilevato, nelle cellule SH-SY5Y differenziate, mediante qRT-PCR, l'incremento dell'espressione del marcatore di differenziamento neuronale GAP-43 (**Fig. 5 d**).

Nelle cellule SH-SY5Y proliferative e differenziate sono stati poi analizzati alcuni epitopi della proteina tau, che – com'è stato già dimostrato nel nostro laboratorio – hanno una grande rilevanza nel processo di differenziamento cellulare delle cellule SK-N-BE e potrebbero essere importanti nell'innescare la neurodegenerazione caratteristica dell'AD. In particolare, sono stati analizzati gli epitopi Tau-1, che corrisponde alla proteina tau con assenza di fosforilazioni nella regione Pro189/Gly207, AT8 che corrisponde alla proteina tau fosforilata nella regione Ser202/Thr205 e Tau-5, che invece identifica la totalità della proteina tau, riconoscendo sia le forme fosforilate che non fosforilate.



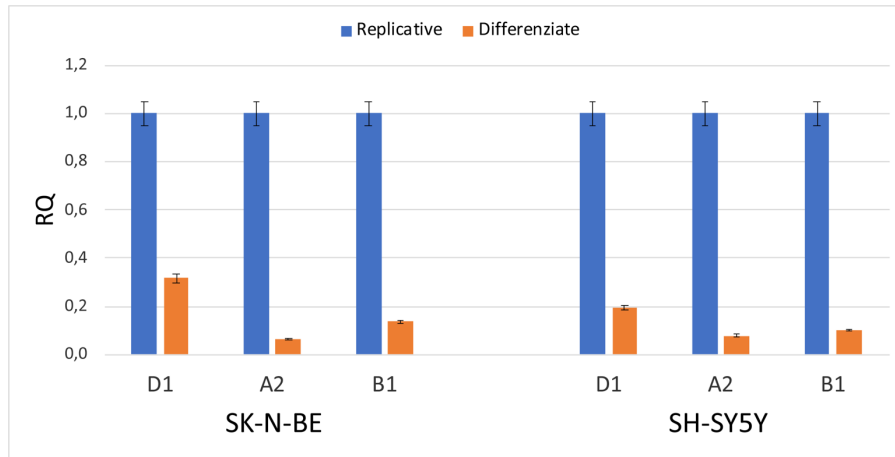
**Figura 6.** Epitopi di tau nella linea cellulare SH-SY5Y. Localizzazione con immunofluorescenza indiretta dual color in cellule replicative (a, b, c) e differenziate con acido retinoico (d, e, f). Gli epitopi della proteina tau e l'antigene Ki-67 sono stati rilevati con differenti anticorpi secondari coniugati con FITC (fluorescenza verde) e TRITC (fluorescenza rossa), rispettivamente. I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Microfotografie ottenute al CSLM, barre di scala: 10  $\mu$ m.

Come sistema di controllo dello stato replicativo o differenziato delle cellule sono stati utilizzati anche diversi marcatori, tra cui UBTF, che è un marcatore della funzionalità nucleolare e Ki-67, marcatore dello stato replicativo delle cellule. Ki-67, che di norma è presente in tutte le fasi del ciclo cellulare nel nucleo delle cellule replicative ma assente nelle cellule differenziate in fase G0 ed è stato osservato, come atteso, nelle cellule replicative nel nucleo e nel nucleolo (**Fig. 6 a, b, c**). Nelle cellule differenziate, Ki-67 è stato osservato, con una fluorescenza più debole associata a qualche spot intranucleare, indicando la presenza di alcune cellule (meno del 20%) che presumibilmente non hanno risposto all'acido retinoico o hanno risposto in ritardo (**Fig. 6**). UBTF è risultato presente nel nucleolo in tutte le tipologie cellulari, anche se con qualche differenza tra le cellule replicative e quelle differenziate (v. prossimo paragrafo).

I risultati relativi alla proteina tau hanno mostrato che l'epitopo Tau-1 è localizzato nel nucleo e in particolare nel nucleolo, presentandosi in molteplici piccoli spot sia nelle cellule replicative che in quelle differenziate (**Fig. 6 a, d**). L'epitopo Tau-5, che invece identifica la totalità della proteina tau, riconoscendo sia le forme fosforilate che non fosforilate, in entrambe le tipologie cellulari analizzate mostra dei segnali extra-nucleari diffusi e non sembra essere un idoneo marcatore nucleolare (**Fig. 6 b, e**). AT8 è risultato assente nelle cellule replicative e presente nel nucleolo delle cellule differenziate (**Fig. 6 c, f**). La distribuzione di Tau-1 e AT8 nelle cellule SH-SY5Y è quindi risultata largamente sovrapponibile a quanto descritto nelle cellule di neuroblastoma SK-N-BE (**Federico et al., 2018**). Questo è un risultato di grande interesse perché ci consente di poter avere a disposizione almeno due linee cellulari con cui saggiare gli aspetti di neurodegenerazione associati con l'AD. In genere, l'utilizzo delle linee cellulari per studi di Genetica è accettato dalla comunità scientifica, ma ottenere dati sovrapponibili in almeno due linee cellulari differenti, rende il risultato più attendibile e più robusto.

Per valutare l'avvenuto differenziamento cellulare delle cellule SH-SY5Y è stata analizzata l'espressione dei geni per le cicline. In particolare, sono state prese in considerazione la ciclina D1 (*CCND1*), che è attiva durante il passaggio dalla fase G0 alla fase G1, la ciclina A2 (*CCNA2*), attiva durante il passaggio dalla fase S alla fase G2 e la ciclina B1 (*CCNB1*), che è attiva durante il passaggio dalla fase G2 alla fase M. I risultati hanno mostrato una diminuzione del livello di espressione di queste tre cicline nelle cellule differenziate rispetto a quelle proliferative (**Fig. 7**). La diminuzione del livello di

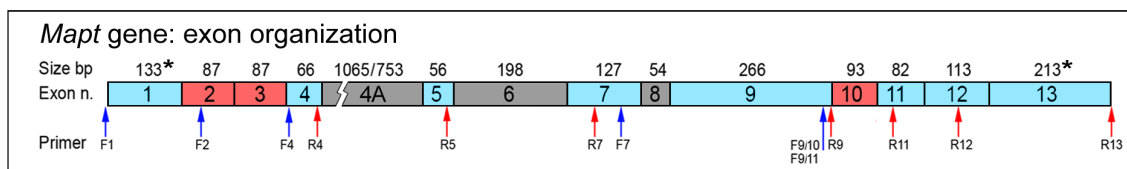
espressione è stata analizzata sia nelle cellule SK-N-BE che nelle SH-SY5Y (Fig. 7) e i dati ottenuti risultano comparabili.



**Figura 7.** Espressione delle cicline D1, A2 e B1 nelle cellule di neuroblastoma SK-N-BE e SH-SY5Y nella condizione replicativa e in quella differenziata mediante induzione con acido retinoico. RQ: quantificazione relativa ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### Analisi dello splicing del gene *MAPT*

Il gene *MAPT* è stato precedentemente analizzato in una differente linea cellulare di neuroblastoma, la linea SK-N-BE, in cui è stata descritta la presenza dell'isoforma più piccola di tau, derivante dallo splicing alternativo che genera l'isoforma 0N3R la cui quantità aumenta nella forma differenziata rispetto alla forma replicativa (Federico et al., 2018). L'analisi dello splicing alternativo del gene *MAPT* nelle cellule SH-SY5Y proliferative e differenziate, effettuata mediante l'uso di primers specifici (Fig. 8) in grado di rilevare la presenza o assenza degli esoni che compongono il gene, ha consentito di stabilire quali isoforme di tau sono presenti in questa linea cellulare. Si è visto, quindi, che nelle SH-SY5Y il gene *MAPT* va incontro a splicing alternativo degli esoni 2/3 e 10 (Fig. 9).



**Figura 8.** Organizzazione degli esoni del gene *MAPT*. Blu: esoni costitutivi; rosso: esoni sottoposti a splicing alternativo; grigio: esoni in genere assenti nelle cellule neuronali. In alto è indicata la lunghezza di ciascun esone, in basso sono indicati i primer forward (frecche blu) e reverse (frecche rosse) (Federico et al., 2018).

Per discriminare le isoforme 0N e/o 1N è stata effettuata una PCR con la coppia di primer F1-R4, che amplifica in modo specifico la regione compresa tra l'esone 1 e l'esone 4, permettendo di visualizzare se gli esoni 2 e 3 vengono eliminati durante la maturazione del trascritto. Da tale amplificazione sono attesi frammenti di tre lunghezze diverse:

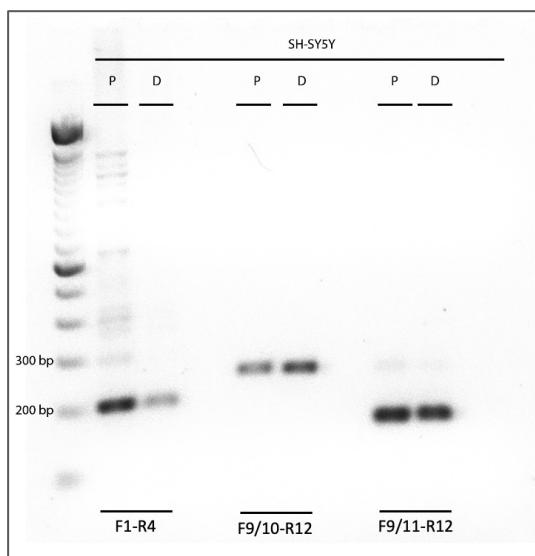
- 0N (196 bp) se sono presenti l'esone 1 (140 bp) e l'esone 4 (56 bp);
- 1N (283 bp) se sono presenti l'esone 1 (140 bp), l'esone 2 (87 bp) e l'esone 4 (56 bp)
- 2N (370 bp) se sono presenti l'esone 1 (140 bp), l'esone 2 (87 bp), l'esone 3 (87 bp) e l'esone 4 (56 bp).

Il risultato ottenuto mostra la presenza, sia nelle cellule proliferative che differenziate, della banda di 196 bp che corrisponde all'isoforma 0N (**Fig. 9**).

La presenza delle isoforme 4R e 3R è stata analizzata con le coppie di primer F9/10-R12 e F9/11-R12 che consentono di distinguere la 4R e la 3R, rispettivamente:

- 4R (257 bp), l'esone 10 è presente (17 + 93 bp + 82 bp + 68 bp)
- 3R (160 bp), l'esone 10 è assente (10 bp + 82 bp + 68 bp).

I risultati hanno mostrato che nelle cellule SH-SY5Y sia proliferative che differenziate con entrambe le coppie di primer si osserva il segmento di DNA atteso (**Fig. 9**). Pertanto, in questa linea cellulare sembrano essere presenti entrambe le isoforme, sia quelle con l'esone 10 sia quelle senza l'esone 10. Quindi, anche nelle cellule SH-SY5Y, sono presenti le isoforme 0N3R e 0N4R, come descritto nella linea cellulare di neuroblastoma SK-N-BE (**Federico et al., 2018**).



**Figura 9.** Analisi dello splicing alternativo del gene *MAPT* nelle cellule SH-SY5Y proliferative (P) e differenziate (D). Le tre coppie di primer utilizzate sono nell'ordine: F1-R4 (per identificare le isoforme 0N, 1N e 2N); F9/10-R12 (per identificare l'isoforma 4R); F9/11-R12 (per identificare l'isoforma 3R).

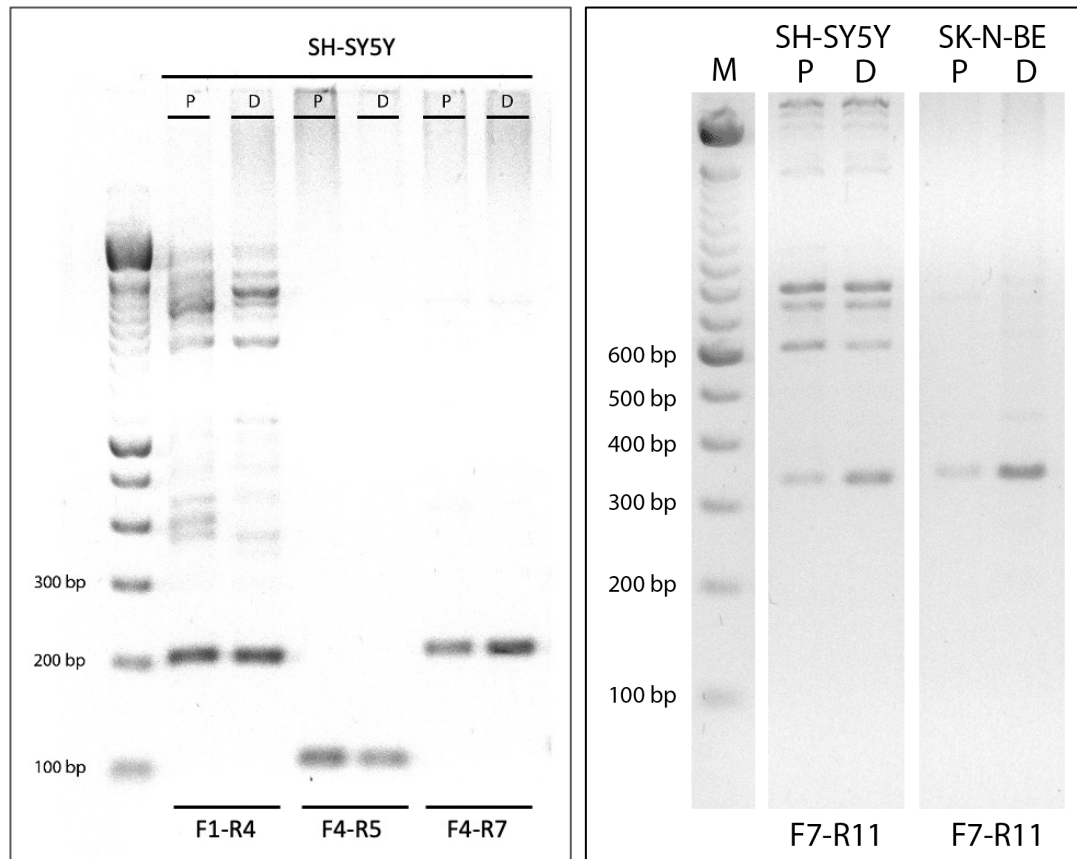
Lo splicing alternativo degli esoni 4A e 6 e 8 è stato anche analizzato per comprendere se questa linea cellulare esprime anche alcune forme di tau meno comuni.

La presenza/assenza dell'esone 4A è stata analizzata con la coppia di primer F4-R5. Questa isoforma dall'elevato peso molecolare (circa 110 kDa), contiene infatti l'esone 4A ed è stata identificata negli anni '90 essendo espressa nel sistema nervoso periferico adulto, nel nervo ottico e nelle linee cellulari derivate dalla cresta neurale (**Fischer and Baas, 2020**). I risultati hanno mostrato la presenza di un amplificato la cui dimensione è compatibile con l'assenza di tale esone (**Fig. 10**). L'eventuale presenza dell'esone 4A avrebbe comportato un frammento di lunghezza pari a 1.065 bp, mentre il frammento osservato è di circa 100 bp, compatibile con la dimensione attesa di 106 bp. La banda posizionata a circa 100 bp, visibile sia nell'amplificato delle cellule proliferative che differenziate conferma quindi che il frammento 4A viene eliminato e di conseguenza la proteina "big tau" non è espressa in questa linea cellulare (**Fig. 10**).

La presenza/assenza dell'esone 6 è stata analizzata con la coppia di primer F4-R7. La presenza di un amplificato di circa 200 bp, compatibile con una dimensione attesa di 204 bp, indica l'assenza nei trascritti del gene *MAPT* dell'esone 6 (la cui dimensione è di 196 bp) (**Fig. 10**).

Infine, la presenza/assenza dell'esone 8 è stata effettuata con la coppia di primer F7-R11, con cui si amplifica la regione compresa tra gli esoni 7 e 9. L'assenza dell'esone 8 è dimostrata dalla banda con le dimensioni comprese tra 300 e 400 bp, compatibile con il frammento atteso che in questo caso è lungo 321 bp (**Fig. 10**). Solo in presenza dell'esone 8, infatti, si otterrebbe un frammento di dimensioni maggiori dato dalla somma delle sequenze degli esoni 7, 8 e 9. Si evince inoltre che il segmento amplificato corrisponde alla isoforma 3R, cioè a quella in cui l'esone 10 è assente.



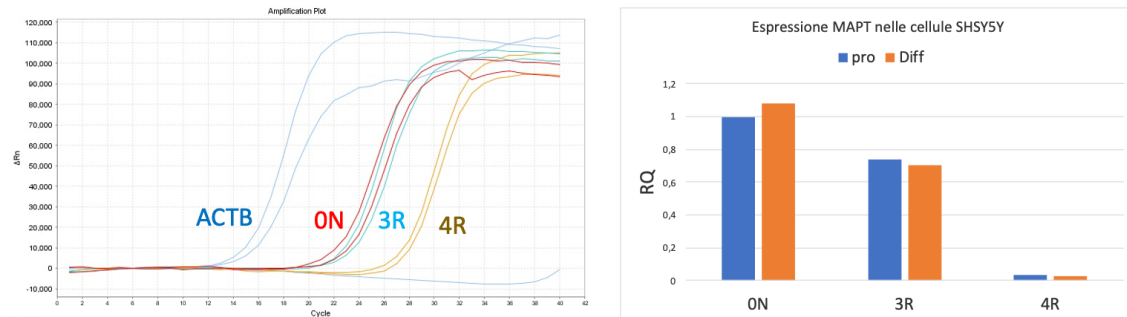


**Figura 10.** Analisi dello splicing alternativo del gene *MAPT* nelle cellule SH-SY5Y proliferative (P) e differenziate (D). Le quattro coppie di primer utilizzate consentono di definire la presenza/assenza degli esoni 2, 3, 4A, 6, 8 e sono, nell'ordine: F1-R4; F4-R5; F4-R7; F7-R11. L'amplificazione con i primers F7-R11 è stata effettuata anche nelle SK-N-BE dove non si osservano gli amplificati non previsti di dimensione superiore a 600 bp.

L'analisi dei livelli di espressione dei trascritti che codificano per le isoforme 0N, 3R e 4R della proteina tau, cioè quelli che sono stati rilevati nelle cellule SH-SY5Y, è stata effettuata mediante PCR quantitativa (**Fig. 11**). L'isoforma maggiormente espressa sia nelle SH-SY5Y replicative che differenziate è quella più corta 0N3R. L'isoforma 0N4R, seppur presente risulta però a livelli molto bassi. Anche in questo caso, in accordo con i dati rilevati precedentemente nella linea cellulare SK-N-BE, in cui è stato dimostrato che la “tau fetale” è quella maggiormente espressa (**Federico et al., 2018**).

I dati di letteratura concordano con questo risultato, infatti le cellule di neuroblastoma replicative e differenziate sono paragonabili ai neuroblasti immaturi e ai neuroni precoci presenti nel feto e pertanto ciò potrebbe spiegare la presenza dell'isoforma fetale 0N3R nelle due linee cellulari. Di conseguenza, le isoforme più lunghe della proteina tau sembrerebbero essere assenti. Una spiegazione potrebbe essere

associata al mancato raggiungimento di un livello di differenziamento avanzato comparabile a quello dei neuroni *in vivo* (Smith et al., 1995).



**Figura 11.** Analisi dell'espressione del gene *MAPT* mediante qPCR nelle cellule SH-SY5Y replicative e differenziate. I primer F1/R4 rilevano l'isoforma ON; i primer F3/R12 rilevano l'isoforma 3R e i primer F4R/R12 rilevano l'isoforma 4R. RQ: quantificazione relativa ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## Il blocco del ciclo cellulare indotto da Act-D

Considerando che la neurodegenerazione nell'AD possa essere correlata a problemi nella regolazione del ciclo cellulare, sono stati effettuati degli esperimenti per indurre artificialmente il blocco del ciclo cellulare in cellule replicative e il riavvio del ciclo cellulare in cellule differenziate. Un sistema che consente di alterare il ciclo cellulare di cellule in coltura consiste nell'incubare le cellule replicative con Actinomicina-D (Act-D), una molecola che blocca la funzionalità nucleolare interferendo con l'attività della RNA polimerasi I. In cellule trattate con Act-D è stata analizzata la presenza e la localizzazione degli epitopi di tau, AT8 e Tau-1. Essendo stati descritti nel nucleolo delle cellule SK-N-BE, tali epitopi sono stati rilevati mediante doppia immunolocalizzazione con il marcatore nucleolare UBTF (*Upstream Binding Transcription Factor*). Inoltre, è stata analizzata mediante qRT-PCR l'espressione dei geni delle cicline D1, A2 e B1.

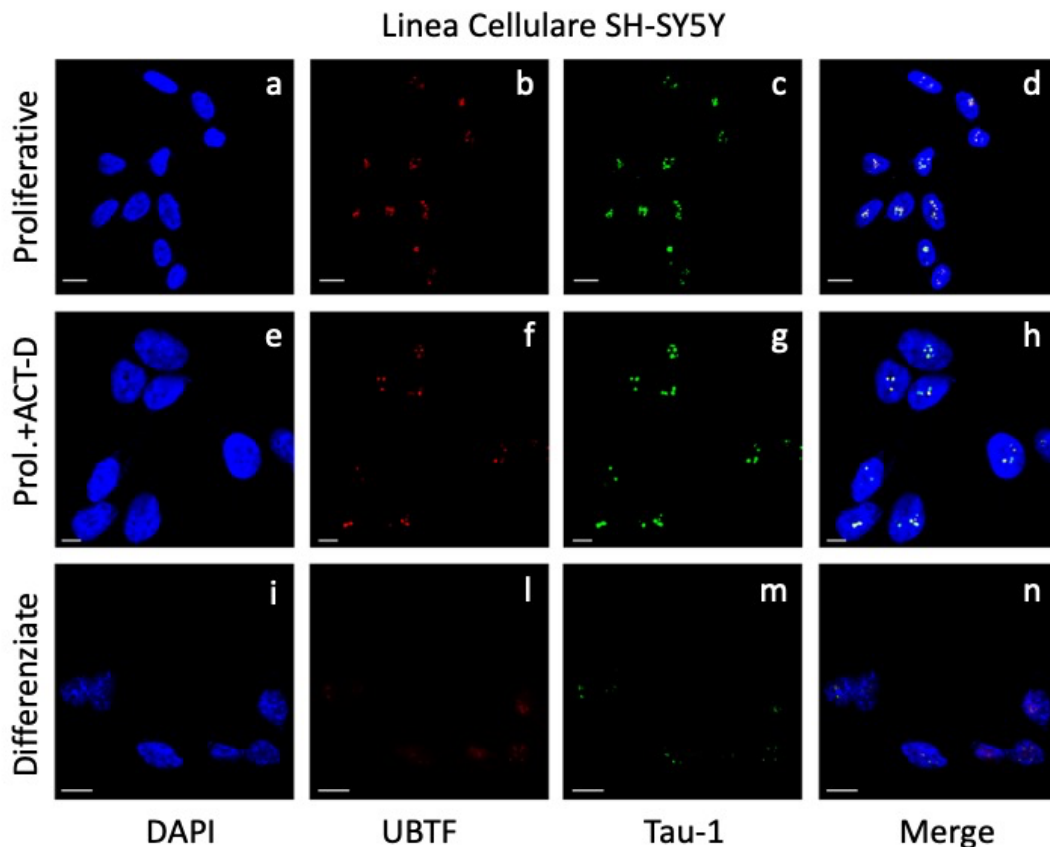
### Localizzazione di Tau-1 e AT8

In dettaglio, sono stati effettuati tre diversi tipi di immunolocalizzazione:

- nelle cellule SH-SY5Y proliferative, che si dividono regolarmente e sono assimilabili ai neuroblasti ancora immaturi;
- nelle cellule SH-SY5Y proliferative trattate con Act-D, agente intercalante che inibisce l'allungamento del trascritto ad opera dell'RNA Pol I e blocca la trascrizione;
- nelle SH-SY5Y trattate con acido retinoico, quindi differenziate e paragonabili ai neuroni umani maturi.

L'analisi mediante CLSM (confocal laser scanning microscope) della distribuzione di Tau-1 ha mostrato una co-localizzazione con il fattore trascrizionale UBTF sia nelle cellule replicative, sia in quelle replicative indotte con Act-D, sia nelle cellule differenziate con acido retinoico (**Fig. 12**). Quindi Tau-1 è sempre presente nel nucleolo delle cellule SH-SY5Y, anche se la tipologia del segnale e la posizione nel nucleolo varia nelle diverse tipologie di cellule. Nelle cellule replicative Tau-1 si presenta sotto forma di tanti piccoli punti (in media circa 8) distribuiti uniformemente nella parte interna del nucleolo. Dopo trattamento con Act-D, Tau-1 si aggrega in un numero minore di punti (in media circa 3) e si sposta alla periferia del nucleolo, sempre co-localizzandosi con UBTF che segue le stesse modifiche posizionali di Tau-1. Nelle cellule SH-SY5Y

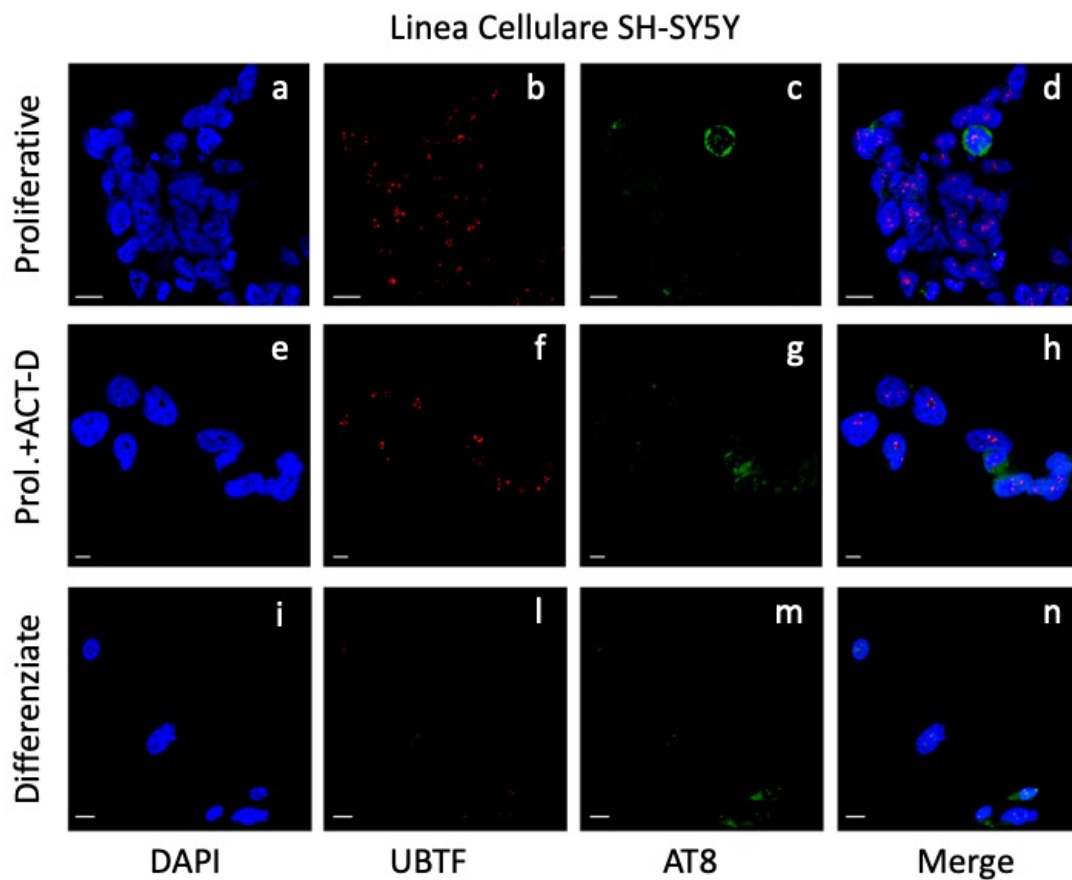
differenziate, Tau-1 si presenta sotto forma di alcuni piccoli segnali posizionati nella parte periferica del nucleolo. Quindi, la presenza di Act-D determina una condizione cellulare simile a quella della condizione differenziata. Le due condizioni sono infatti accomunate, oltre a quanto esposto sopra in merito alla posizione di Tau-1, dalla diminuita funzionalità del nucleolo, intesa come livello di espressione dei geni per l'rRNA (Federico et al., 2018).



**Figura 12.** Microfotografie al CSLM della dual color IFI di Tau-1 e UBTF in cellule proliferative, proliferative con Actinomicina-D e differenziate. I nuclei sono colorati con DAPI (a, e, i), UBTF è marcato in rosso (b, f, l), l'epitopo Tau-1 in verde (c, g, m). Barre di scala: 10  $\mu\text{m}$  in a, b, c, d, i, l, m, n; 5  $\mu\text{m}$  in e, f, g, h.

AT8 identifica in modo specifico le forme fosforilate nella regione Ser202/Thr205 e in condizione replicativa le cellule osservate, tranne sporadiche eccezioni, non mostrano la presenza di questo epitopo a livello nucleare e presentano invece numerosi piccoli spot corrispondenti a UBTF, che è localizzato in tutte le cellule a livello dei nucleoli, dimostrando che questi compartimenti sono attivi e stanno

producendo rRNA (**Fig. 13 d**). Le cellule trattate con Act-D, quindi dopo inibizione della trascrizione dell'rDNA, mostrano una debole fluorescenza corrispondente ad AT8 che co-localizza con UBTF ai margini dei nucleoli dove formano degli spot di grandi dimensioni (**Fig. 13 h**). Anche nella condizione differenziata è stata osservata la presenza di AT8 in piccoli spot co-localizzati con UBTF (**Fig. 13 n**). La distribuzione di AT8 nelle cellule SH-SY5Y indica che tale epitopo è assente nelle cellule replicative mentre compare nelle cellule differenziate e in quelle indotte con Act-D, la cui condizione trascrizionale è simile alle cellule differenziate.



**Figura 13.** Immunolocalizzazione di AT8 dopo il blocco trascrizionale indotto da Actinomicina-D. I nuclei sono colorati con DAPI (a, e, i), il fattore di trascrizione UBTF è marcato in rosso (b, f, l), l'epitopo AT8 in verde (c, g, m). Barre di scala: 10  $\mu\text{m}$  in a, b, c, d, i, l, m, n; 5  $\mu\text{m}$  in e, f, g, h.

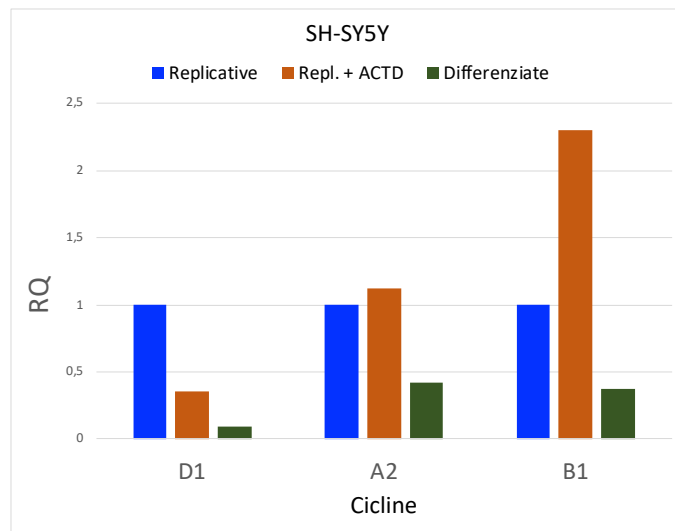
La distribuzione di AT8 nelle cellule SH-SY5Y concorda largamente con quella precedentemente descritta nelle cellule SK-N-BE (**Federico et al., 2018**). Una differenza riscontrata sembra essere la presenza di una minore quantità di AT8 nelle cellule SH-

SY5Y replicative indotte con Act-D, rispetto alle cellule SK-N-BE nelle stesse condizioni di coltura.

Quindi, AT8 si conferma, così come dimostrato nelle cellule SK-N-BE, un chiaro marcatore del differenziamento neuronale. Da notare, inoltre, che nella stessa posizione nucleolare delle cellule differenziate, sia SK-N-BE che SH-SY5Y, sono presenti due diverse forme della proteina tau, la forma non fosforilata Tau-1 e la forma fosforilata AT8. Entrambe le forme co-localizzano con il fattore trascrizionale UBTF.

### Analisi dell'espressione delle cicline

Per valutare l'avvenuto differenziamento cellulare delle cellule SH-SY5Y è stata analizzata l'espressione di geni per le cicline D1, A2 e B1. La diminuzione del livello di espressione di tali cicline nelle cellule indotte con Act-D è stata osservata solo con la ciclina D1, mentre con le cicline A2 e B1 non si osserva tale diminuzione. Questo conferma il blocco trascrizionale indotto da tale molecola, anche se l'abbassamento del livello di espressione della ciclina D1 non è comparabile a quello delle cellule differenziate. Ciò è presumibilmente dovuto alla presenza di una certa quantità di trascritto che dopo un'ora di induzione con Act-D è ancora presente nelle cellule.



**Fig. 14.** Espressione delle cicline nelle cellule SH-SY-5Y replicative incubate con Act-D. RQ: quantificazione relativa ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

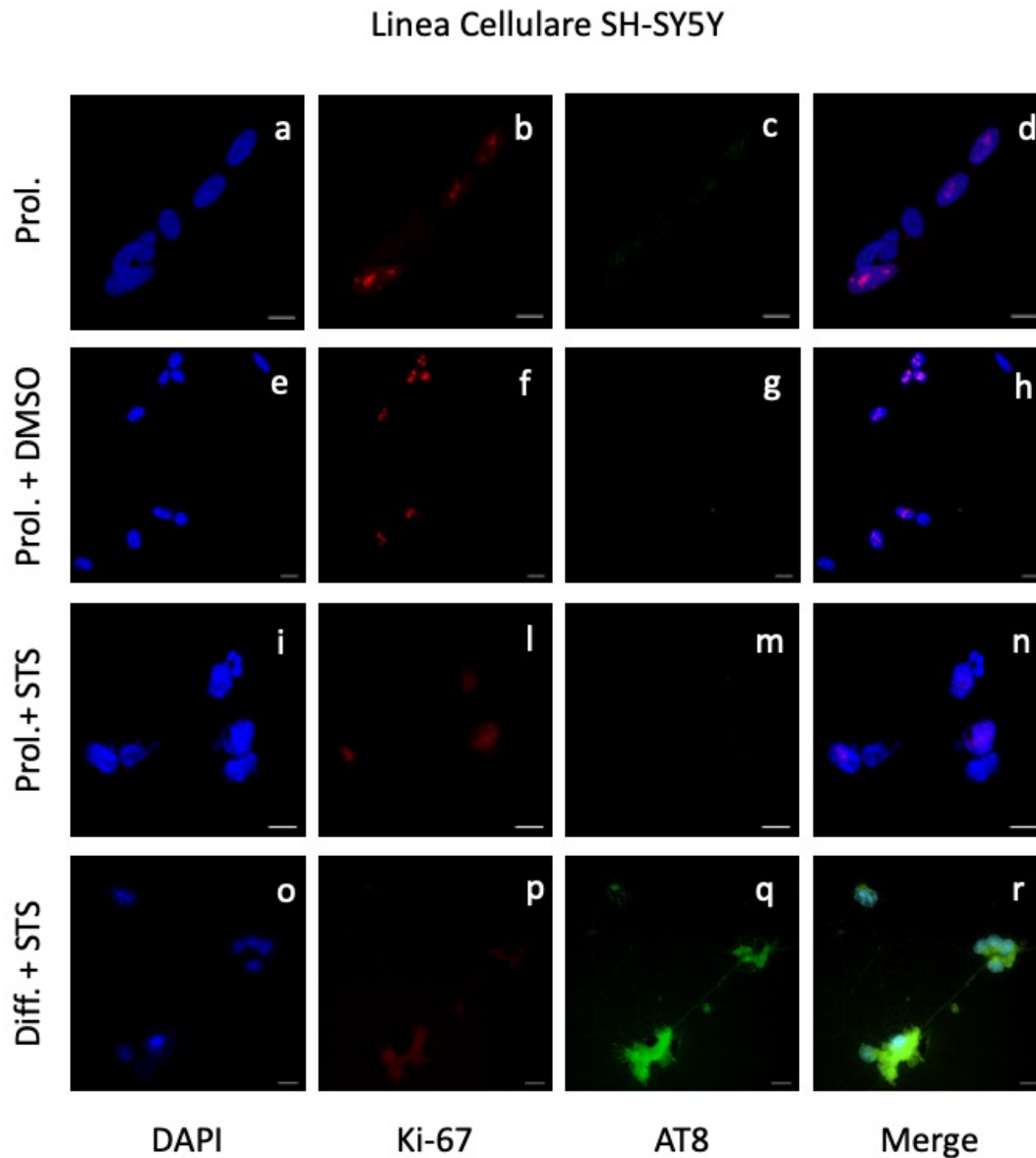
## Alterazione del ciclo cellulare in cellule differenziate

La condizione ipotizzata per la degenerazione neuronale nell'AD consiste nel tentativo di riattivare il ciclo cellulare da parte di cellule differenziate e questo comporterebbe uno sbilanciamento fisiologico tale da portare alla morte della cellula. Sono state prese in considerazione diverse molecole che possono indurre nel nostro sistema *in vitro* una de-regolazione del ciclo cellulare e/o la morte cellulare. Tra queste molecole, quelle che sono state ritenute più utili per gli scopi del presente lavoro sono state la forskolina, che dati di letteratura denotano come induttore della iperfosforilazione di tau nei siti AT8, e l'anilina, una molecola che in base alle concentrazioni utilizzate potrebbe indurre avvio del ciclo cellulare. Inoltre, è stata utilizzata anche la staurosporina che è un noto induttore di morte cellulare mediante apoptosi. L'azione di tali molecole sul ciclo cellulare è stata rilevata mediante la variazione di espressione di specifiche cicline, note per essere marcatori di specifici momenti del ciclo cellulare: passaggio dalla fase G0 alla fase G1 (ciclina *CCND1*), passaggio dalla fase G1 alla fase S (ciclina *CCNE1*), passaggio dalla fase S alla fase G2 (ciclina *CCNA2*); antigene nucleare delle cellule proliferative (*PCNA*) e passaggio dalla fase G2 alla fase M del ciclo cellulare (ciclina *CCNB1*).

### Trattamento con staurosporina

La staurosporina è un noto induttore di morte mediante apoptosi (**Schultheiss et al., 2012**) e dati di letteratura mostrano che il trattamento con tale sostanza su linee cellulari di glioma umano inibisce la proliferazione e induce il blocco in fase S delle cellule, senza alterare l'espressione delle cicline D1 e D3 che regolano la fase G. Al contrario i livelli di cicline A e B subiscono un decremento, dato che queste proteine si attivano normalmente dopo la fase di sintesi del DNA (**Harmalkar and Shirsat, 2006**).

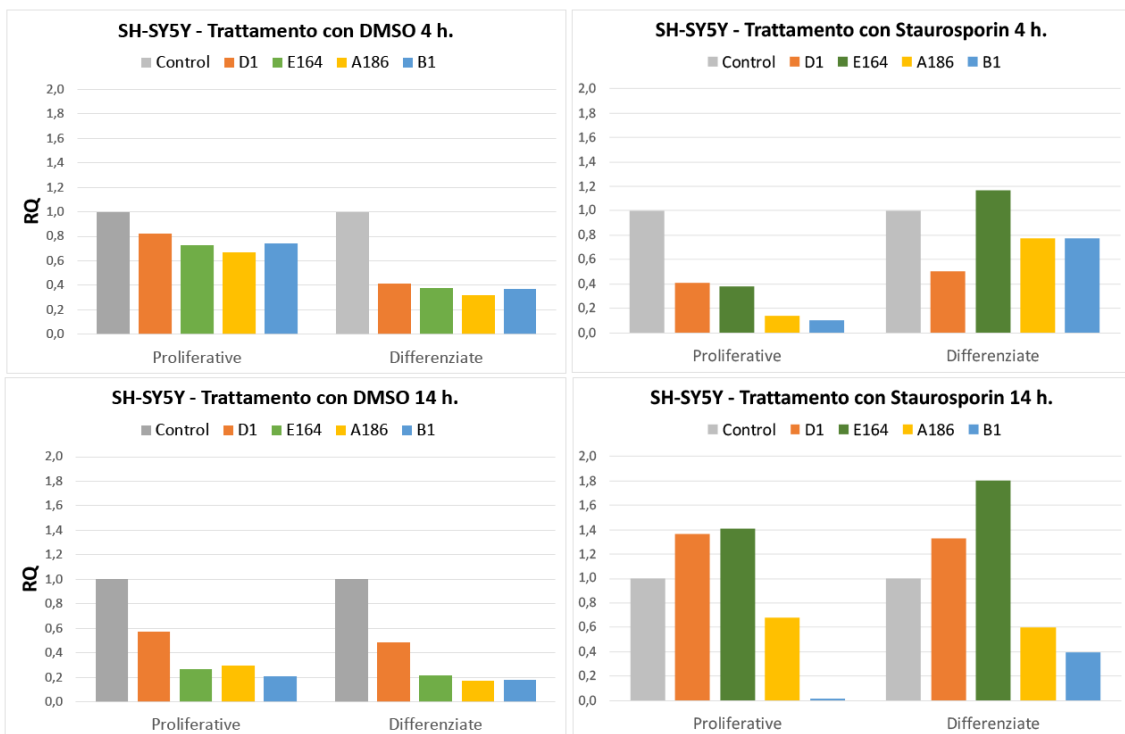
Il trattamento delle cellule SH-SY5Y con staurosporina per 4 e 14 ore mostra l'avvio della morte cellulare mediante apoptosi. Infatti, l'effetto apoptotico della staurosporina su tali cellule viene confermato dall'immunofluorescenza che mostra i nuclei colorati con DAPI frammentati e di forma irregolare sia nelle SH-SY5Y proliferative che differenziate trattate. Inoltre, non è rilevabile né la presenza di AT8 né quella di Ki-67, il marcatore del ciclo cellulare attivo (**Fig 15**).



**Figura 15.** Effetti del trattamento con staurosporina (STS). Immunolocalizzazione dual color dopo trattamento con STS per 14 ore. Le cellule proliferative non trattate e quelle con DMSO, solvente della staurosporina, sono state utilizzate come controllo. I nuclei sono marcati con DAPI; Ki-67, espresso nelle cellule proliferative, è marcato in rosso e AT8 è marcato in verde. Barre di scala: 10  $\mu$ m.

L'analisi della variazione dell'espressione delle cicline in risposta alla morte cellulare per apoptosi indotta dalla staurosporina ha mostrato che dopo 14 ore si ha un lieve incremento delle cicline D1 ed E1 e un abbassamento del livello di espressione delle cicline A2 e B1 (**Fig. 16**), in buona coerenza rispetto a quanto atteso.





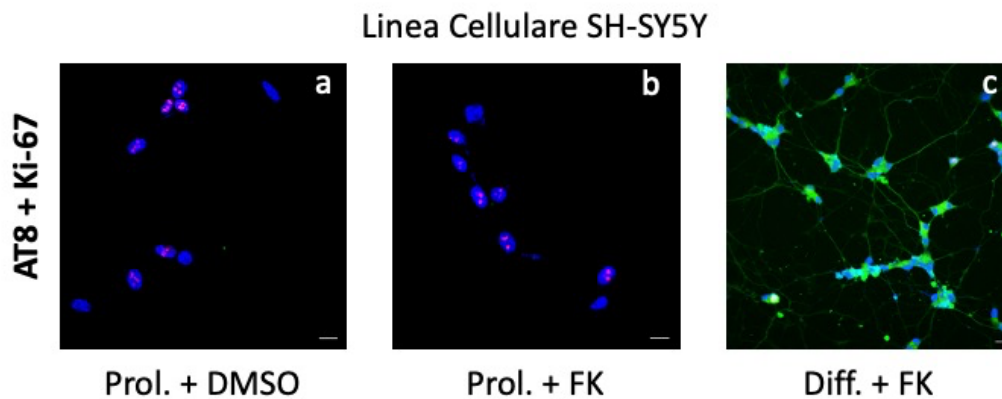
**Figura 16.** Analisi dell'espressione dei geni *CCND1* (D1), *CCNE1* (E164), *CCNA2* (A186), *CCNB1* (B1) mediante qPCR nelle cellule SH-SY5Y replicative e differenziate dopo trattamento con staurosporina per 4 e 14 ore. RQ: quantificazione relativa di ciascun campione ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## Trattamento con forskolina

La forskolina è una sostanza che attiva in modo specifico la protein-chinasi A (PKA), inducendo l'iperfosforilazione della proteina tau nei residui S202/T205 (AT8), S214 e S396. Il suo effetto è stato in precedenza studiato in colture primarie di neuroni dell'ippocampo di topo, dove è stata osservata una variazione dell'espressione delle cicline D1 e B1 (Wang et al., 2018). Allo stesso modo, data l'azione di attivazione dell'iperfosforilazione di tau ci attendiamo che nelle cellule di neuroblastoma differenziate si verifichi una situazione paragonabile a quella rilevata nei modelli murini. Considerando che le cellule SH-SY5Y differenziate possono essere paragonate ai neuroni maturi, dopo l'aggiunta di forskolina (4  $\mu$ M per 4 e 14 ore) e l'induzione dell'iperfosforilazione di tau, dovremmo visualizzare un aumento dei livelli delle cicline associato al possibile tentativo di riavvio del ciclo cellulare. Ciò potrebbe corrispondere a quanto si verifica *in vivo* nei neuroni malati, che inizierebbero un ciclo cellulare

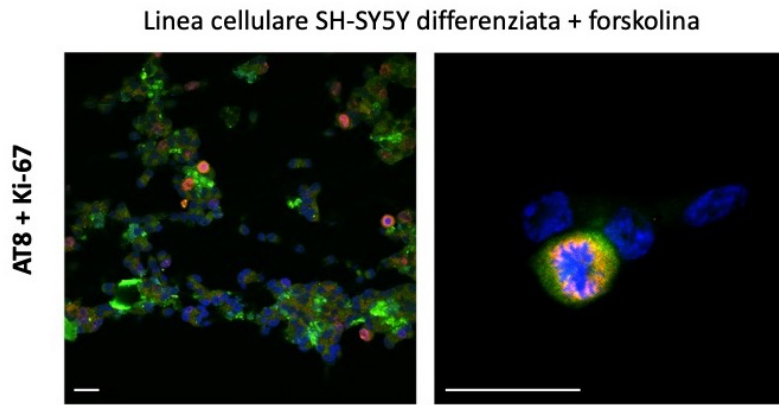
aberrante uscendo dalla fase G0 e avviandosi verso le ulteriori fasi, senza però completarle e avviandosi invece verso la degenerazione cellulare.

L'utilizzo della forskolina nelle cellule SH-SY5Y replicative non sembra alterare l'espressione degli epitopi della proteina tau, con AT8 che rimane assente nei nuclei cellulari sia in presenza che in assenza di forskolina (**Fig 13R a, b**). Nelle cellule SH-SY5Y differenziate, invece, la forskolina induce chiaramente iperfosforilazione di tau, come osservabile mediante immunolocalizzazione di AT8, che si osserva in grandi quantità non solo a livello nucleare e nucleolare, ma anche nel citoplasma e lungo i prolungamenti delle cellule differenziate, mettendo in evidenza la fitta rete di collegamenti intercellulari tipici delle cellule differenziate con acido retinoico (**Fig 17 c**).



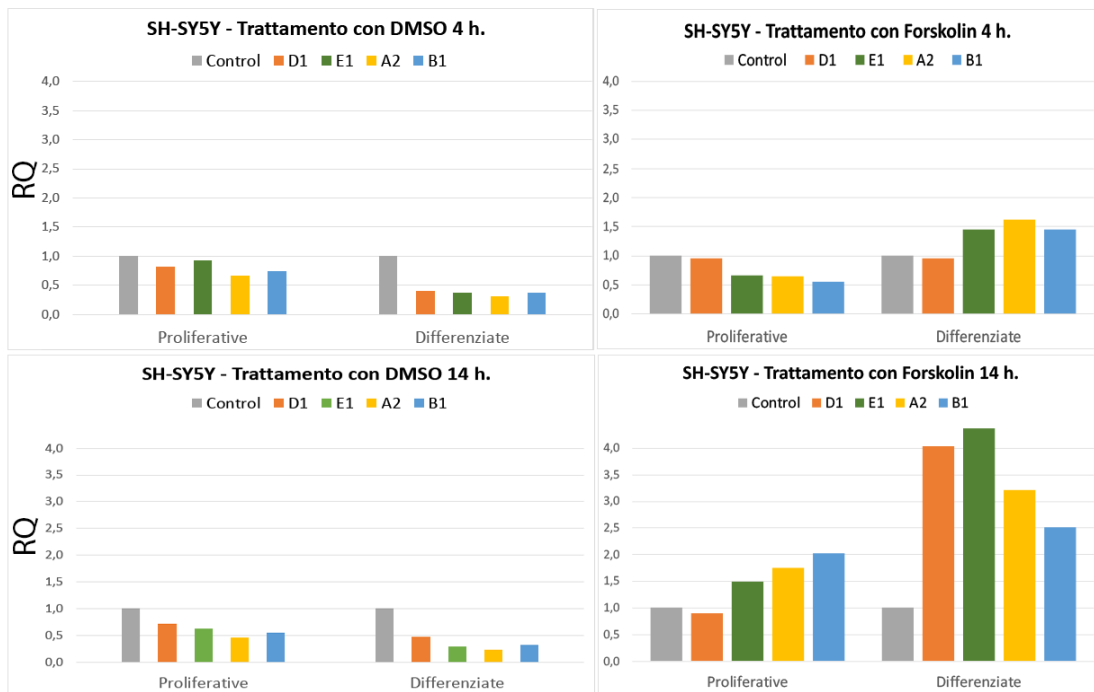
**Figura 17.** Immunolocalizzazione di tau fosforilata dopo trattamento con forskolina (FK) per 14 ore. I nuclei sono marcati con DAPI (blu), l'antigene Ki-67 (rosso) è presente nelle cellule proliferative di controllo trattate con DMSO (solvente della forskolina) e nelle cellule proliferative trattate con FK, l'epitopo AT8 (verde) è localizzato nei nuclei e nei prolungamenti delle cellule SH-SY5Y differenziate. Barre di scala: 10  $\mu$ m in a, b, c.

Il trattamento con forskolina delle cellule SH-SY5Y differenziate determina non solo la comparsa di una grande quantità di tau iperfosforilata (condizione tipica della neurodegenerazione nella malattia di Alzheimer), ma anche la comparsa sporadica di Ki-67 attorno al nucleo di alcune cellule (**Fig 18**). L'espressione di Ki-67 è insolita nelle cellule differenziate, inoltre la distribuzione di AT8 è atipica e questo potrebbe indicare che il cambiamento dello stato di fosforilazione dovuto al trattamento con la forskolina, e la conseguente induzione della iperfosforilazione nei siti AT8, potrebbe mimare ciò che accade realmente nei neuroni che stanno andando incontro a degenerazione, determinando un tentativo di ripresa del ciclo di divisione cellulare.



**Figura 18.** Immunolocalizzazione dual color di AT8 e Ki-67 in cellule SH-SY5Y trattate con forskolina per 14 ore. I nuclei sono marcati con DAPI (blu), Ki-67 è rilevato con un anticorpo secondario coniugato a TRITC (rosso), AT8 con un anticorpo secondario coniugato a FITC (verde). Barre di scala: 20 µm.

L'incremento delle cicline innescato dal riavvio del ciclo in seguito alla iperfosforilazione non dovrebbe, invece, essere rilevato nelle cellule proliferative che essendo in attiva replicazione esprimono livelli più o meno elevati di tutte le cicline in base al momento del ciclo cellulare in cui si trovano. Lo studio della variazione dell'espressione delle cicline (D1, E1, A2, B1) conferma che nelle SH-SY5Y proliferative non vi è alcun incremento dopo 4 ore dal trattamento con forskolina e un lieve incremento dopo 14 ore, rispetto al controllo non trattato. Inoltre, anche in quest'ultimo caso i livelli



**Figura 19.** Livelli di espressione delle cicline nella linea cellulare SH-SY5Y dopo trattamento con forskolina 4 µM per 4 e 14 ore. I geni delle cicline *CCND1* (D1), *CCNE1* (E164), *CCNA2* (A186) e *CCNB1* (B1) sono stati analizzati mediante qPCR. RQ: quantificazione relativa di ciascun campione ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

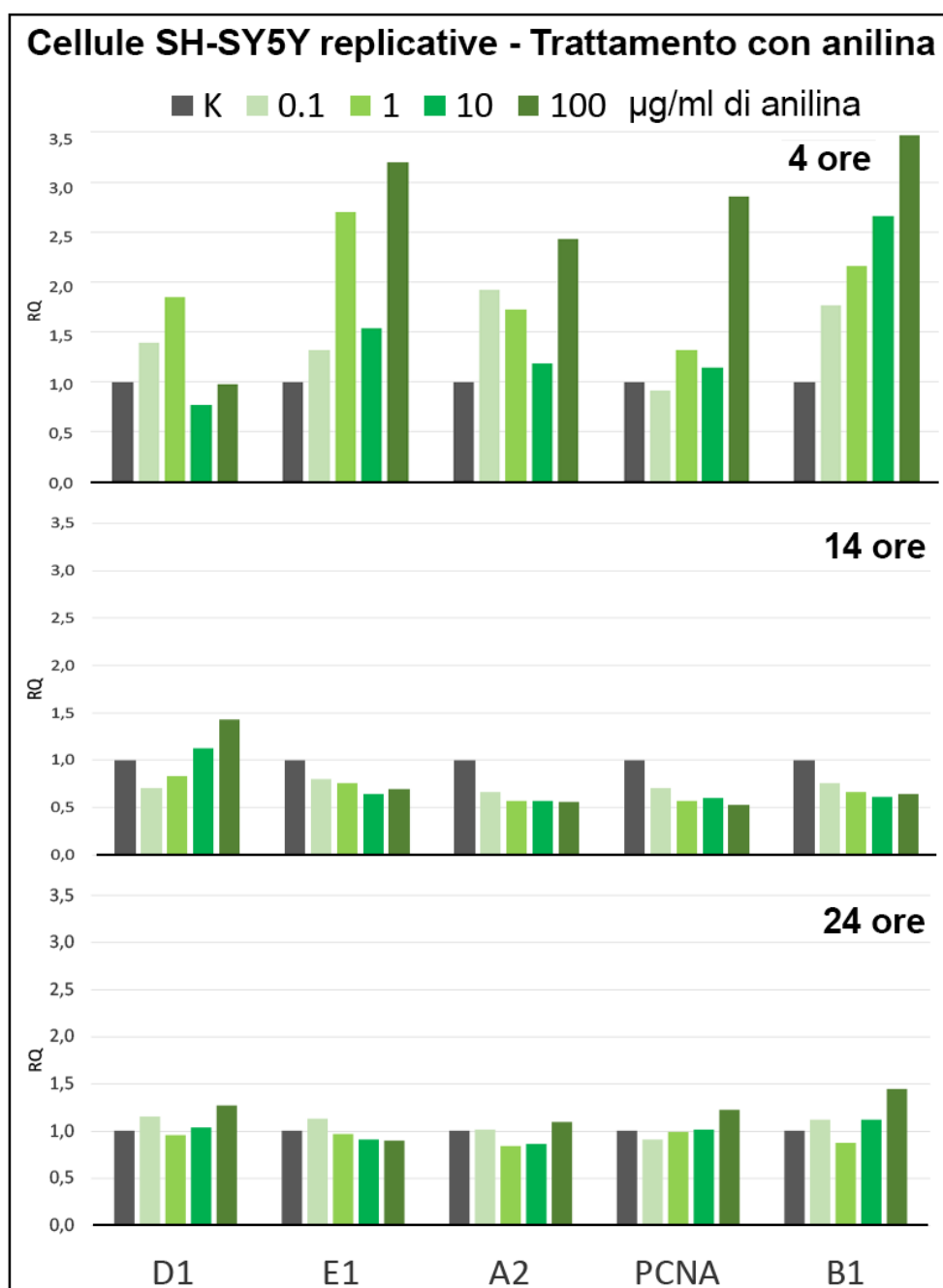
di espressione di tutte le cicline analizzate sono comunque inferiori se paragonate all'incremento che si verifica nelle cellule differenziate trattate con forskolina dove, come atteso, si registrano livelli di espressione più che raddoppiati (**Fig. 19**).

### **Trattamento con anilina**

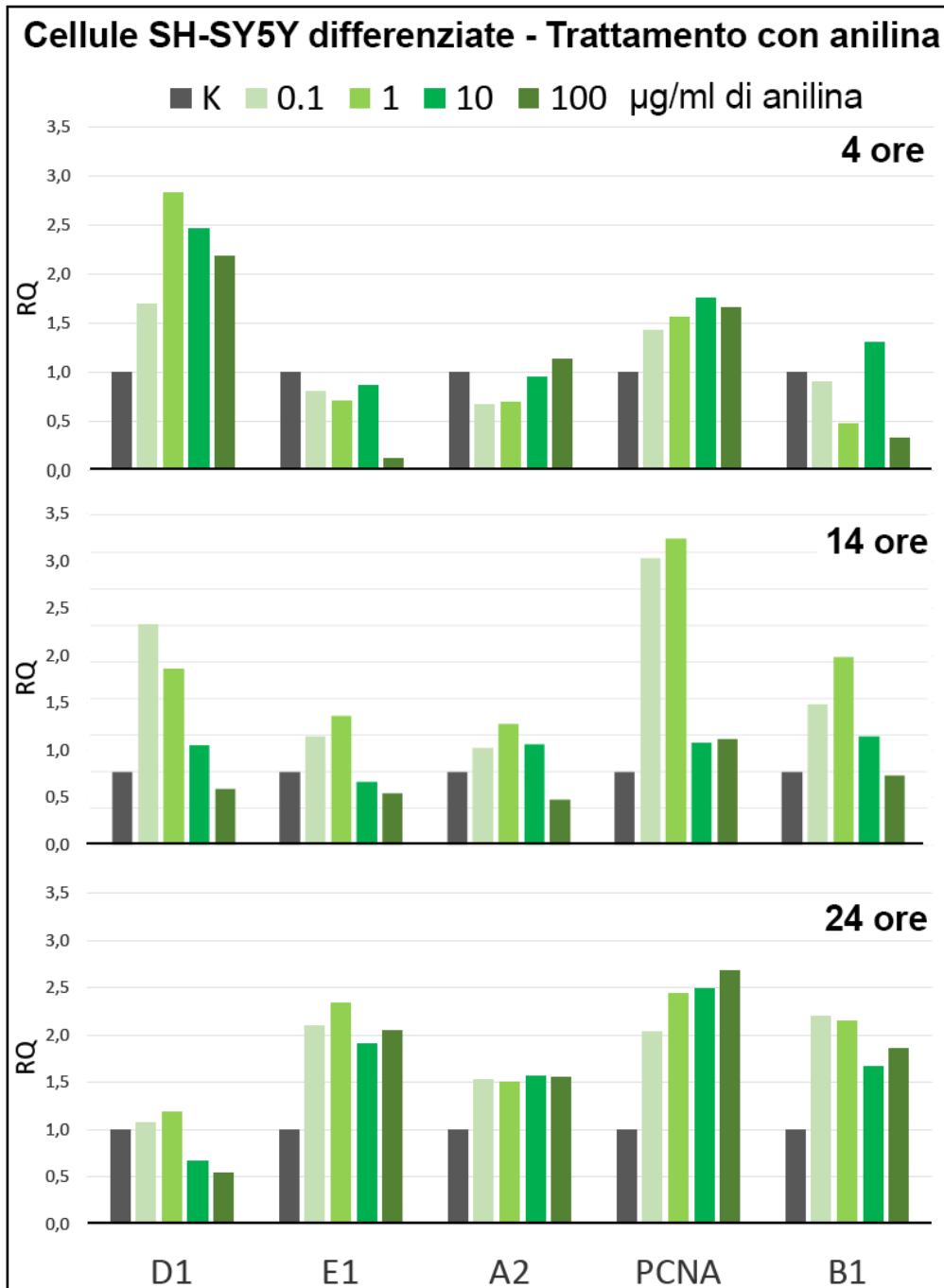
L'anilina è una sostanza che induce stress ossidativo nelle cellule. Dal punto di vista chimico, si tratta di un'ammina aromatica ampiamente utilizzata in ambito industriale per la produzione di coloranti, erbicidi, fungicidi, esplosivi e prodotti a base di gomma. L'esposizione a questa molecola causa variazioni dell'espressione degli enzimi coinvolti nel metabolismo del ferro, tra cui HO-1 (Heme Oxygenase-1), con possibile azione pro-ossidativa tossica per le cellule. La formazione di ROS, infatti, provoca perossidazione lipidica, ossidazione delle proteine e danni al DNA e può essere correlata anche con disfunzioni mitocondriali dovute alla modifica del potenziale di membrana con conseguente variazione della permeabilità in diverse tipologie cellulari (**Wang et al., 2010; Wang et al., 2016**). Le specie reattive dell'ossigeno hanno un ruolo cruciale nella patogenesi di malattie quali l'artrite reumatoide, patologie cardiovascolari, patologie legate all'invecchiamento e cancro. Nel ratto sono stati dimostrati gli effetti neurotossici dell'anilina, che agisce su diversi componenti del sistema nervoso, causando vacuolazione della materia bianca del SNC e degenerazione delle fibre dei nervi periferici (**Makhdoumi et al., 2019**).

Dopo l'aggiunta di anilina a varie concentrazioni e per vari tempi è stato osservato un aumento dei livelli delle cicline nelle cellule replicative solo alle concentrazioni più alte e nelle prime ore del trattamento (**Fig. 20**). Successivamente, a 14 e 24 ore di trattamento, i livelli di espressione delle diverse cicline nei campioni trattati arrivano a livelli paragonabili a quelli delle cellule replicative di controllo. Nelle cellule SH-SY5Y differenziate con acido retinoico, i livelli delle cicline si innalzano dopo 24 ore (**Fig. 21**), indicando il possibile riavvio del ciclo cellulare. La ciclina D1 è la prima a rispondere all'induzione dell'anilina e dopo 4 ore viene espressa a livelli almeno doppi rispetto ai valori di partenza. Gradualmente il livello di tale ciclina diminuisce portandosi dopo 24 ore ai livelli basali delle cellule differenziate. Le altre cicline analizzate mostrano invece un graduale incremento, raggiungendo valori circa doppi rispetto ai livelli delle cellule differenziate con le cicline E1, PCNA e B1. La ciclina A2 si ferma a livelli di 1,5

volte rispetto al controllo. È quindi evidente, il tentativo delle cellule differenziate di avviare un ciclo di divisione cellulare, attivando l'espressione delle cicline.



**Figura 20.** Livelli di espressione delle cicline nelle cellule SH-SY5Y replicative dopo trattamento con anilina a diverse concentrazioni e per 4, 14 e 24 ore rispetto alle cellule proliferative di controllo (K) non trattate con la sostanza. L'espressione dei geni delle cicline *CCND1* (D1), *CCNE1* (E1), *CCNA2* (A2), PCNA e *CCNB1* (B1) è stata analizzata mediante qPCR. RQ: quantificazione relativa di ciascun campione ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



**Figura 21.** Livelli di espressione delle cicline nelle cellule SH-SY5Y differenziate con acido retinoico dopo trattamento con anilina a diverse concentrazioni e per 4, 14 e 24 ore rispetto alle cellule differenziate di controllo (K) non trattate con la sostanza. L'espressione dei geni delle cicline *CCND1* (D1), *CCNE1* (E1), *CCNA2* (A2), PCNA e *CCNB1* (B1) è stata analizzata mediante qPCR. RQ: quantificazione relativa di ciascun campione ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## Blocco della riattivazione del ciclo cellulare

La riattivazione del ciclo cellulare, indicata dall'aumento dell'espressione delle cicline entro le prime 24 ore di induzione con forskolina e anilina, potrebbe rappresentare la condizione in cui si potrebbero trovare i neuroni dei soggetti AD allo stadio iniziale della neurodegenerazione. È stata quindi analizzata l'espressione delle cicline nelle cellule SH-SY5Y per un tempo maggiore di esposizione alle suddette molecole e, inoltre, si è valutato il possibile utilizzo di tale effetto per testare molecole con proprietà neuroprotettive per valutarne il possibile uso per bloccare l'avvio imprevisto del ciclo cellulare. In quest'ultimo caso, è stato utilizzato il peptide PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), considerato un agente neurotrofico e neuroprotettivo.

Il PACAP è espresso sia nel sistema nervoso centrale che periferico, è coinvolto nelle regioni cerebrali soggette a neurodegenerazione in condizione patologica e, fisiologicamente, svolge le proprie funzioni legando il suo recettore specifico di membrana PAC1 a livello dei gangli basali, dell'ippocampo e della corteccia cerebrale (Reglodi et al., 2011). L'effetto dell'aggiunta di PACAP nelle cellule in cui è stata indotta la riattivazione del ciclo cellulare è stato valutato tramite la variazione dell'espressione delle cicline D1, E1, A2 e B1.

### Trattamento con forskolina e PACAP

L'aumento dei livelli delle cicline nelle cellule SH-SY5Y differenziate sembra associato al possibile tentativo di riattivazione del ciclo cellulare (Fig. 19), che potrebbe mimare la condizione dei neuroni malati *in vivo* che si avviano a degenerazione.

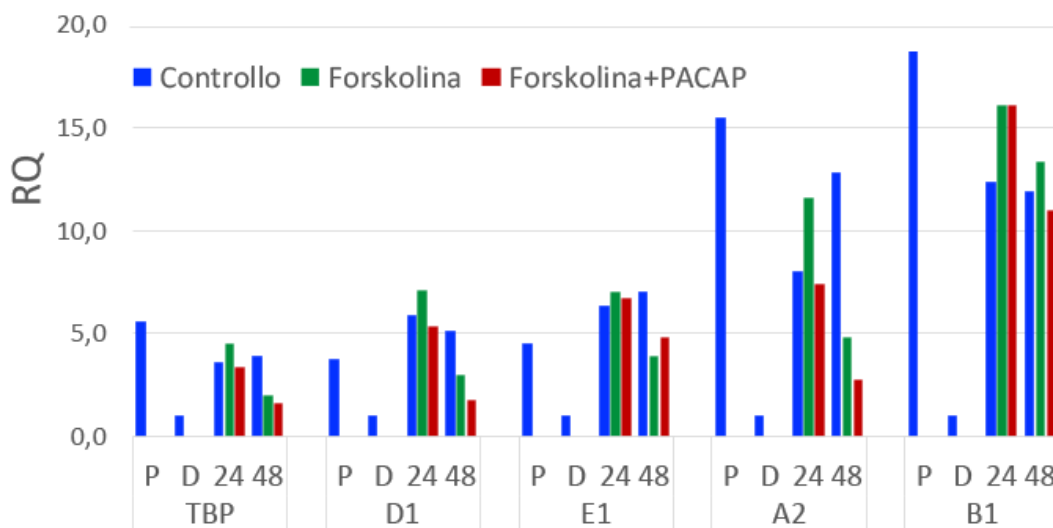
Dato che il ciclo cellulare intrapreso da tali neuroni, sembrerebbe un ciclo cellulare aberrante che si conclude con la neurodegenerazione, sono stati osservati i livelli di espressione delle cicline nelle cellule differenziate e trattate con forskolina per tempi più lunghi. Il destino delle cellule avviate alla degenerazione dovrebbe, infatti, comportare un decremento dei livelli di cicline (rispetto all'incremento rilevato dopo 14 ore) a causa dell'innescarsi dei processi di morte cellulare.

L'utilizzo di sostanze neurotrofiche e neuroprotettive quali il PACAP, al contrario, potrebbe contrastare la degenerazione, determinando invece la proliferazione delle cellule e, ipoteticamente, favorire la neurogenesi.

Dati di letteratura affermano che PACAP può svolgere ruoli cruciali nell'omeostasi del sistema nervoso. Il legame PACAP/PAC1 può attivare vie di

segnalazione multiple, tra cui le vie adenilil ciclasi/cAMP, fosfolipasi C/DAG/PKC, MEK/ERK, PI3K/Akt che a loro volta innescano meccanismi di segnalazioni più ampi che promuovono la sopravvivenza neuronale, la proliferazione e il differenziamento durante il neurosviluppo e bloccano o attenuano i processi pro-apoptotici (Liao et al., 2019).

L'espressione di D1, E1, A2 e B1 nelle cellule trattate con forskolina per 48 ore non ha mostrato significative variazioni rispetto alle 24 ore, eccetto per la ciclina A2 che a 48 ore mostra un minor livello di espressione. L'uso del PACAP, in aggiunta alla forskolina, ha invece evidenziato una diminuzione del livello di espressione delle cicline molto più marcato dopo 48 ore rispetto alle 24 ore. Tale decremento è molto marcato nelle cicline D1 e A2, i cui valori ritornano molto prossimi ai valori iniziali (Fig. 22). Di conseguenza, sembrerebbe che PACAP abbia un ruolo nel contrastare l'avvio del ciclo cellulare e quindi, della conseguente degenerazione delle cellule nervose, in queste condizioni. Gli effetti della forskolina consistono nell'attivazione dell'adenilil ciclasi (AC), con conseguente aumento del cAMP citosolico che provoca l'attivazione della chinasi PKA e la fosforilazione di molecole target a valle della cascata di segnalazione cAMP/PKA. La via AC/cAMP è, tuttavia, coinvolta anche nelle attività di PACAP, essendo il meccanismo principale di segnalazione del recettore PAC1, che può a sua volta avviare altre vie metaboliche, tra cui quella di cAMP/PKA (Hardwick et al., 2017).

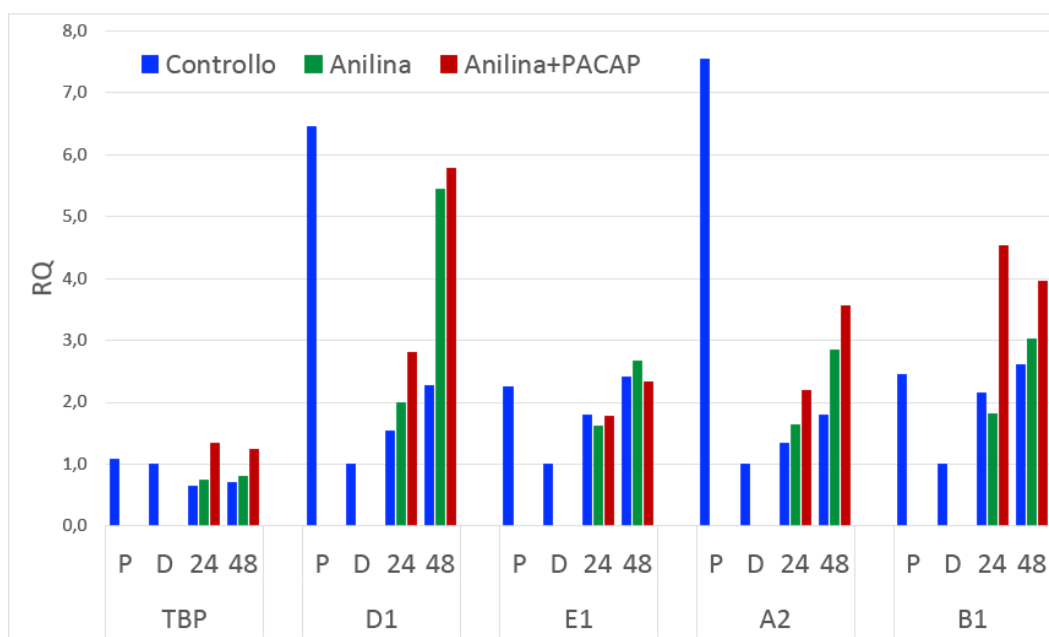


**Figura 22.** Analisi della variazione dell'espressione delle cicline nelle cellule SH-SY5Y differenziate trattate con forskolina e PACAP per 24 e 48 ore. P: cellule proliferative; D: cellule differenziate con acido retinoico. 24: trattamento con forskolina + PACAP per 24 ore; 48: trattamento con forskolina + PACAP per 48 ore. TBP: gene di controllo nella qPCR. RQ: quantificazione relativa di ciascun campione ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



## Trattamento con anilina e PACAP

La segnalazione PACAP/PAC1 può intervenire nell'abolire, moderare o ritardare i danni neuronali causati dallo stress ossidativo o da altre variazioni della normale omeostasi cellulare (Liao et al., 2019). Pertanto, con l'utilizzo dell'anilina, già nota per contribuire alla produzione di ROS nella cellula, e con il contemporaneo trattamento con PACAP si attende un effetto protettivo che potrebbe essere evidenziato dall'aumento dei livelli di cicline e quindi dalla ripresa della proliferazione cellulare. In effetti, l'analisi della variazione dell'espressione di D1, E1, A2 e B1 mostra un aumento di tutte le cicline nelle cellule trattate simultaneamente con anilina e PACAP sia rispetto ai controlli, sia rispetto alle cellule trattate solo con anilina (Fig. 23). Tale incremento è rilevabile sia dopo 24 che 48 ore. Questo risultato è in contrapposizione con l'effetto del PACAP in combinazione con la forskolina, dove invece era stata osservata una azione di contrasto alla ripresa del ciclo cellulare.



**Figura 23.** Analisi della variazione dell'espressione delle cicline nelle cellule SH-SY5Y differenziate trattate con anilina e PACAP per 24 e 48 ore. P: cellule proliferative; D: cellule differenziate con acido retinoico. 24: trattamento con anilina + PACAP per 24 ore; 48: trattamento con anilina + PACAP per 48 ore. TBP: gene di controllo nella qPCR. RQ: quantificazione relativa di ciascun campione ottenuta applicando la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

---

## Conclusioni

Data la mancanza di trattamenti efficaci per le patologie neurodegenerative correlate all'invecchiamento, potrebbero essere presi in considerazione nuovi approcci terapeutici che abbiano come target i geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare.

Gli esperimenti descritti in questa tesi di dottorato hanno infatti confermato che i neuroni, in determinate condizioni quali la presenza di stimoli esogeni che modificano la struttura delle proteine neuronali (forskolina) o che inducono stress ossidativo (anilina), rispondono tentando di riattivare il ciclo di divisione mitotica. Tuttavia, essendo questa una condizione fisiologicamente non prevista nelle cellule differenziate, l'attivazione imprevista dei sistemi di regolazione del ciclo cellulare che inducono la cellula ad entrare prima in fase G1 e poi ad avviarsi verso la divisione mitotica, determina un blocco in una delle fasi successive e culmina nella degenerazione, ovvero nella morte del neurone.

I risultati ottenuti nelle cellule SH-SY5Y differenziate con acido retinoico e trattate con forskolina o anilina mostrano un aumento dell'espressione delle cicline che intervengono nei passaggi chiave del ciclo cellulare (ciclina D1 per la transizione G0/G1, ciclina E1 per la transizione G1/S, ciclina A2 per la transizione S/G2 e ciclina B1 per la transizione G2/M). L'induzione dell'aumento dell'espressione delle cicline con molecole esogene consente di analizzare la neurodegenerazione *in vitro* associata a deregolazione del ciclo cellulare, e consente di studiare i cambiamenti metabolici che possono avere un ruolo determinante nell'avvio della morte neuronale in condizioni patologiche quali la malattia di Alzheimer o altre taupatie. Tale sistema è stato validato studiando inizialmente il differenziamento neuronale della linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y attraverso analisi morfologica, immunolocalizzazione di marcatori specifici (Ki-67, UBTF, Tau-1, AT8) ed espressione del marcatore di differenziamento GAP-43. Questo ha consentito di porre l'attenzione sulla proteina tau, presente in differenti isoforme con diversa localizzazione nelle cellule replicative, differenziate e, infine, avviate alla neurodegenerazione. Infatti, l'induzione dell'iperfosforilazione di tau indotta con forskolina nelle cellule differenziate, paragonabili ai neuroni maturi, ha determinato una rilocalizzazione del marcatore AT8 che, evidenzia come in tali cellule si posiziona non solo a livello nucleare ma anche nei prolungamenti ed appare insieme a Ki-67, tipico marcatore delle cellule proliferative, che dimostra la riattivazione o comunque il tentativo di riattivazione del ciclo cellulare.

---

La linea cellulare SH-SY5Y è quindi un buon modello di differenziamento neuronale *in vitro*, che ci permette di studiare sia le cellule replicative assimilabili ai neuroblasti immaturi, sia le cellule differenziate, sia quelle avviate verso la neurodegenerazione. Questo consente di effettuare studi sulla neurodegenerazione senza la necessità di dover utilizzare materiale biologico umano o animale o di fare studi *in vivo* che necessitino di protocolli specifici e molto restrittivi associati a problematiche bioetiche.

L'uso delle cellule differenziate *in vitro* con acido retinoico, ha consentito di dimostrare che, sotto l'azione di specifiche molecole tali cellule tentano di riattivare il ciclo cellulare, come dimostrato dall'incremento dell'espressione delle cicline, che è coerente con l'ipotesi del "ciclo cellulare" quale meccanismo alla base della neurodegenerazione osservata nella malattia di Alzheimer. Questo consente di poter ipotizzare una insorgenza della malattia possibilmente associata a qualche scompensamento nel sistema ormonale dell'organismo che induce le cellule nervose dell'ippocampo alla degenerazione. Ricerche che possano correlare parametri biochimici dell'organismo a molecole che possano indurre il ciclo cellulare con la presenza della malattia potrebbe essere una via di studio interessante da avviare in futuro.

Un aspetto importante sull'uso di un sistema di degenerazione cellulare *in vitro* può riguardare lo studio di molecole che possano contrastare l'avvio imprevisto del ciclo cellulare e quindi di ripristinare la condizione differenziata originaria prima che la cellula ne abbia un danno irreparabile. Tra le molecole che sono state utilizzate per verificare la presenza di una eventuale azione che possa contrastare l'avvio imprevisto del ciclo cellulare vi è il PACAP, noto per la sua azione neuroprotettiva. Il PACAP è un peptide con una struttura amminoacidica altamente conservata in tutti i mammiferi ed è espresso sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico. L'utilizzo di questa sostanza in associazione con la forskolina e l'anilina ha però dato esiti diversi. Nel primo caso, infatti, ha determinato una diminuzione dell'espressione delle cicline D1, E1, A2 e B1, facendo così ipotizzare un possibile meccanismo di competizione con la forskolina, dato che entrambe le molecole sembrano agire sulle stesse vie metaboliche cellulari attivando le reazioni a valle della via di segnalazione AC/cAMP. Al contrario, l'effetto di PACAP in cellule trattate con anilina e quindi sottoposte a stress ossidativo ha determinato un incremento dei livelli di cicline consentendo di ipotizzare che in questo caso il sistema *in vitro* tenta di ripristinare l'attività proliferativa con produzione di nuovi neuroblasti. In

---

base ai risultati ottenuti, il PACAP sembra modulare l'effetto di molecole che inducono l'avvio del ciclo cellulare, anche se i suoi effetti sono complessi e vanno analizzati ulteriormente. Indagini più approfondite potranno indicare se il PACAP possa essere considerato una molecola promettente nell'indurre una azione anti-proliferativa nei neuroni in cui si sia impropriamente avviato il ciclo cellulare.

Altre molecole potrebbero essere analizzate *in vitro* con lo stesso sistema di differenziamento e induzione della proliferazione cellulare con anilina e forskolina per consentire una maggiore comprensione delle vie di segnalazione che intervengono nella protezione dei neuroni e nella loro proliferazione in risposta ai malfunzionamenti cellulari o ai segnali di avvio della neurodegenerazione associati alle patologie correlate all'invecchiamento, al fine di individuare nuove strategie terapeutiche per trattare l'AD e le altre malattie neurodegenerative. Sostanze utili per questo scopo potrebbero essere quelle introdotte con l'alimentazione che, con le loro eventuali proprietà nutrigenomiche, potrebbero essere appositamente utilizzate per bilanciare lo stress ossidativo o per regolare l'espressione genica ostacolando la neurodegenerazione. A titolo esemplificativo, potrebbero essere saggiate in futuro, nel sistema cellulare *in vitro*, molecole come la proteina fotosintetica ficocianina (phycocyanin, PC) prodotta da un gruppo di alghe blu-verdi appartenenti al genere *Arthrospira* (Imai et al., 2021), la betalaina che è un pigmento rosso con attività antiossidante, l'indicaxantina che ha proprietà infiammatorie (entrambe contenute nei fichi d'india) (Guerrero-Rubio et al., 2019) ed altre molecole contenute in cibi di uso comune quali la curcumina (curcuma), il resveratrolo (uva, mirtilli), lo shogaolo (zenzero), i ginsenosidi (ginseng) e i tanshinoni (salvia). Queste sostanze, note per le loro proprietà antinfiammatorie e antiossidanti, potrebbero essere dei potenziali neuroprotettori e agire prevenendo o contrastando la progressione della degenerazione neuronale nel corso dell'invecchiamento dell'individuo (Agnihotri and Aruoma, 2019). Differenti risposte nei confronti delle molecole contenute nei cibi potrebbero dipendere dal patrimonio genetico di ciascun soggetto e di conseguenza l'azione reciproca di nutrizione, genoma e condizione fisiologica dell'organismo, che è alla base degli studi di nutrigenetica, risulta soprattutto adesso di grande rilevanza. È auspicabile, quindi, effettuare ulteriori ricerche per comprendere e dimostrare l'efficacia di potenziali agenti neurotrofici e neuroprotettivi alimentari che potrebbero già essere stati individuati ma che non sono ancora caratterizzati in modo

esaustivo per quanto riguarda la loro azione sul DNA dell'individuo con finalità terapeutiche o di prevenzione nei confronti delle malattie neurodegenerative.

---

## Bibliografia

- Agnihotri A, Aruoma OI. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Nutritional Toxicology Perspective of the Impact of Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, Nutrigenomics and Environmental Chemicals. *J Am Coll Nutr.* 2020 Jan;39(1):16-27.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 1995;8(6):429-31.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 1978 Nov;38(11 Pt 1):3751-7.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):574-85.
- Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T. Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4344-9.
- Bukar Maina M, Al-Hilaly YK, Serpell LC. Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease. *Biomolecules.* 2016 Jan 7;6(1):9.
- Calegari F, Huttner WB. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci.* 2003 Dec 15;116(Pt 24):4947-55.
- Cao L, Chen F, Yang X, Xu W, Xie J, Yu L. Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evol Biol.* 2014 Jan 17;14:10.
- Demir O, Singh S, Klimaschewski L, Kurnaz IA. From birth till death: neurogenesis, cell cycle, and neurodegeneration. *Anat Rec (Hoboken).* 2009 Dec;292(12):1953-61.
- Engel FB, Hauck L, Boehm M, Nabel EG, Dietz R, von Harsdorf R. p21(CIP1) Controls proliferating cell nuclear antigen level in adult cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 2003 Jan;23(2):555-65.
- Federico C, Bruno F, Sturiale V, D'Amico AG, Maugeri G, D'Agata V, Gil L, Saccone S. Human nuclear tau and aging, In: *Factors Affecting Neurological Aging* Eds Colin R. Martin, Victor R. Preedy, Rajkumar Rajendram, Elsevier Academic Press, 2021, Pages 71-81, ISBN 9780128179901.
- Federico C, Gil L, Bruno F, D'Amico AG, D'Agata V, Saccone S. Phosphorylated nucleolar Tau protein is related to the neuronal in vitro differentiation. *Gene.* 2018 Jul 20;664:1-11.

- 
- Fischer I, Baas PW. Resurrecting the Mysteries of Big Tau. *Trends Neurosci.* 2020 Jul;43(7):493-504.
- Floutsakou I, Agrawal S, Nguyen TT, Seoighe C, Ganley AR, McStay B. The shared genomic architecture of human nucleolar organizer regions. *Genome Res.* 2013 Dec;23(12):2003-12.
- Folch J, Junyent F, Verdaguer E, Auladell C, Pizarro JG, Beas-Zarate C, Pallàs M, Camins A. Role of cell cycle re-entry in neurons: a common apoptotic mechanism of neuronal cell death. *Neurotox Res.* 2012 Oct;22(3):195-207.
- Fung TK, Poon RY. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Jun;16(3):335-42.
- Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell.* 1990 Feb 9;60(3):487-94.
- Gil L, Federico C, Pinedo F, Bruno F, Rebolledo AB, Montoya JJ, Olazabal IM, Ferrer I, Saccone S. Aging dependent effect of nuclear tau. *Brain Res.* 2017 Dec 15;1677:129-137.
- Goedert M. Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Feb;15(1):45-9.
- Gonnot F, Langer D, Bourillot PY, Doerflinger N, Savatier P. Regulation of Cyclin E by transcription factors of the naïve pluripotency network in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle.* 2019 Oct;18(20):2697-2712.
- González-Magaña A, Blanco FJ. Human PCNA Structure, Function and Interactions. *Biomolecules.* 2020 Apr 8;10(4):570.
- Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Oct;6(10):777-88.
- Guerrero-Rubio MA, Hernández-García S, García-Carmona F, Gandía-Herrero F. Extension of life-span using a RNAi model and in vivo antioxidant effect of *Opuntia* fruit extracts and pure betalains in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chem.* 2019 Feb 15;274:840-847.
- Hardwick JC, Clason TA, Tompkins JD, Girard BM, Baran CN, Merriam LA, May V, Parsons RL. Recruitment of endosomal signaling mediates the forskolin modulation of guinea pig cardiac neuron excitability. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017 Aug 1;313(2):C219-C227.
- Hardwick LJ, Ali FR, Azzarelli R, Philpott A. Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2015 Jan;359(1):187-200.
- Harmalkar MN, Shirsat NV. Staurosporine-induced growth inhibition of glioma cells is accompanied by altered expression of cyclins, CDKs and CDK inhibitors. *Neurochem Res.* 2006 May;31(5):685-92.

- He X, Jiang W, Luo Z, Qu T, Wang Z, Liu N, Zhang Y, Cooper PR, He W. IFN- $\gamma$  regulates human dental pulp stem cells behavior via NF- $\kappa$ B and MAPK signaling. *Sci Rep*. 2017 Jan 18;7:40681.
- Hégarat N, Crncec A, Suarez Peredo Rodriguez MF, Echegaray Iturra F, Gu Y, Busby O, Lang PF, Barr AR, Bakal C, Kanemaki MT, Lamond AI, Novak B, Ly T, Hochegger H. Cyclin A triggers Mitosis either via the Greatwall kinase pathway or Cyclin B. *EMBO J*. 2020 Jun 2;39(11):e104419.
- Hernandez-Verdun D. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol*. 2006 Jan;125(1-2):127-37.
- Hindley C, Philpott A. Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system. *Biochem J*. 2012 Jun 15;444(3):375-82.
- Imai Y, Koseki Y, Hirano M, Nakamura S. Nutrigenomic Studies on the Ameliorative Effect of Enzyme-Digested Phycocyanin in Alzheimer's Disease Model Mice. *Nutrients*. 2021 Dec 10;13(12):4431.
- Jackman M, Firth M, Pines J. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J*. 1995 Apr 18;14(8):1646-54.
- Jackson PK. The hunt for cyclin. *Cell*. 2008 Oct 17;135(2):366.
- Kandimalla RJ, Prabhakar S, Wani WY, Kaushal A, Gupta N, Sharma DR, Grover VK, Bhardwaj N, Jain K, Gill KD. CSF p-Tau levels in the prediction of Alzheimer's disease. *Biol Open*. 2013 Sep 4;2(11):1119-24.
- Kanska J, Zakhour M, Taylor-Harding B, Karlan BY, Wiedemeyer WR. Cyclin E as a potential therapeutic target in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2016 Oct;143(1):152-158.
- Koundrioukoff S, Jónsson ZO, Hasan S, de Jong RN, van der Vliet PC, Hottiger MO, Hübscher U. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J Biol Chem*. 2000 Jul 28;275(30):22882-7.
- Lafontaine DLJ, Riback JA, Bascetin R, Brangwynne CP. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Mar;22(3):165-182.
- Liao C, de Molliens MP, Schneebeli ST, Brewer M, Song G, Chatenet D, Braas KM, May V, Li J. Targeting the PAC1 Receptor for Neurological and Metabolic Disorders. *Curr Top Med Chem*. 2019;19(16):1399-1417.
- Liu C, Zong H. Developmental origins of brain tumors. *Curr Opin Neurobiol*. 2012 Oct;22(5):844-9.
- Liu L, Michowski W, Kolodziejczyk A, Sicinski P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol*. 2019 Sep;21(9):1060-1067.



- 
- Majd S, Power J, Majd Z. Alzheimer's Disease and Cancer: When Two Monsters Cannot Be Together. *Front Neurosci.* 2019 Mar 1;13:155.
- Majd S, Zarifkar A, Rastegar K, Takhshid MA. Different fibrillar Abeta 1-42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle. *Brain Res.* 2008 Jul 7;1218:224-9.
- Makhdoumi P, Hossini H, Ashraf GM, Limoe M. Molecular Mechanism of Aniline Induced Spleen Toxicity and Neuron Toxicity in Experimental Rat Exposure: A Review. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(3):201-213.
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001 Dec;1(3):222-31.
- Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014;15(6):122.
- Marlier Q, D'aes T, Verteneuil S, Vandenbosch R, Malgrange B. Core cell cycle machinery is crucially involved in both life and death of post-mitotic neurons. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Nov;77(22):4553-4571.
- McStay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008;24:131-57.
- McStay B. Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *Genes Dev.* 2016 Jul 15;30(14):1598-610.
- Musgrove EA. Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors.* 2006 Mar;24(1):13-9.
- Musicco M, Adorni F, Di Santo S, Prinelli F, Pettenati C, Caltagirone C, Palmer K, Russo A. Inverse occurrence of cancer and Alzheimer disease: a population-based incidence study. *Neurology.* 2013 Jul 23;81(4):322-8.
- Ohnuma S, Harris WA. Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron.* 2003 Oct 9;40(2):199-208.
- Ohnuma S, Philpott A, Harris WA. Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2001 Feb;11(1):66-73.
- Parlato R, Kreiner G, Erdmann G, Rieker C, Stotz S, Savenkova E, Berger S, Grummt I, Schütz G. Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice. *J Neurosci.* 2008 Nov 26;28(48):12759-64.
- Planas-Silva MD, Weinberg RA. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Dec;9(6):768-72.
- Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. New insights into nucleolar architecture and activity. *Int Rev Cytol.* 2006;255:177-235.

- Reglodi D, Kiss P, Lubics A, Tamas A. Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des.* 2011;17(10):962-72.
- Saldivar JC, Hamperl S, Bocek MJ, Chung M, Bass TE, Cisneros-Soberanis F, Samejima K, Xie L, Paulson JR, Earnshaw WC, Cortez D, Meyer T, Cimprich KA. An intrinsic S/G2 checkpoint enforced by ATR. *Science.* 2018 Aug 24;361(6404):806-810.
- Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene.* 2009 Aug 20;28(33):2925-39.
- Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol.* 1998 Nov;35(6):461-78.
- Schindowski K, Belarbi K, Bretteville A, Ando K, Buée L. Neurogenesis and cell cycle-reactivated neuronal death during pathogenic tau aggregation. *Genes Brain Behav.* 2008 Feb;7 Suppl 1(1):92-100.
- Schultheiss M, Schnichels S, Miteva K, Warstat K, Szurman P, Spitzer MS, Van Linthout S. Staurosporine-induced differentiation of the RGC-5 cell line leads to apoptosis and cell death at the lowest differentiating concentration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012 Aug;250(8):1221-9.
- Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 2004 Nov 15;18(22):2699-711.
- Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1059-65.
- ShIPLEY MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp.* 2016 Feb 17;(108):53193.
- Siu KT, Rosner MR, Minella AC. An integrated view of cyclin E function and regulation. *Cell Cycle.* 2012 Jan 1;11(1):57-64.
- Smith CJ, Anderton BH, Davis DR, Gallo JM. Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. *FEBS Lett.* 1995 Nov 20;375(3):243-8.
- Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS Jr. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci.* 1995 Sep;15(9):6046-57.
- Takashima A, Ohtomo M, Kikuchi T, Iwashita J, Abe T, Hata K. Differentiation- and apoptosis-inducing activities of rice bran extracts in a human colon cancer cell line. *J Food Sci Technol.* 2013 Jun;50(3):595-9.
- Takizawa CG, Morgan DO. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Dec;12(6):658-65.
- Tchakarska G, Sola B. The double dealing of cyclin D1. *Cell Cycle.* 2020 Jan;19(2):163-178.

- Teixeira LK, Reed SI. Cyclin E Deregulation and Genomic Instability. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1042:527-547.
- Tessari MA, Gostissa M, Altamura S, Sgarra R, Rustighi A, Salvagno C, Caretti G, Imbriano C, Mantovani R, Del Sal G, Giancotti V, Manfioletti G. Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2. *Mol Cell Biol.* 2003 Dec;23(24):9104-16.
- Tsai RY, McKay RD. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol.* 2005 Jan 17;168(2):179-84.
- Veas-Pérez de Tudela M, Delgado-Esteban M, Maestre C, Bobo-Jiménez V, Jiménez-Blasco D, Vecino R, Bolaños JP, Almeida A. Regulation of Bcl-xL-ATP Synthase Interaction by Mitochondrial Cyclin B1-Cyclin-Dependent Kinase-1 Determines Neuronal Survival. *J Neurosci.* 2015 Jun 24;35(25):9287-301.
- Wang HH, Li Y, Li A, Yan F, Li ZL, Liu ZY, Zhang L, Zhang J, Dong WR, Zhang L. Forskolin Induces Hyperphosphorylation of Tau Accompanied by Cell Cycle Reactivation in Primary Hippocampal Neurons. *Mol Neurobiol.* 2018 Jan;55(1):696-706.
- Wang J, Ma H, Boor PJ, Ramanujam VM, Ansari GA, Khan MF. Up-regulation of heme oxygenase-1 in rat spleen after aniline exposure. *Free Radic Biol Med.* 2010 Feb 15;48(4):513-8.
- Wang Y, Gao H, Na XL, Dong SY, Dong HW, Yu J, Jia L, Wu YH. Aniline Induces Oxidative Stress and Apoptosis of Primary Cultured Hepatocytes. *Int J Environ Res Public Health.* 2016 Nov 30;13(12):1188.
- Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Jan;17(1):5-21.
- Wasner M, Haugwitz U, Reinhard W, Tschöp K, Spiesbach K, Lorenz J, Mössner J, Engeland K. Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human cyclin B2 promoter. *Gene.* 2003 Jul 17;312:225-37.
- Yang C, Ionescu-Tiba V, Burns K, Gadd M, Zukerberg L, Louis DN, Sgroi D, Schmidt EV. The role of the cyclin D1-dependent kinases in ErbB2-mediated breast cancer. *Am J Pathol.* 2004 Mar;164(3):1031-8.
- Yuan Z, Becker EB, Merlo P, Yamada T, DiBacco S, Konishi Y, Schaefer EM, Bonni A. Activation of FOXO1 by Cdk1 in cycling cells and postmitotic neurons. *Science.* 2008 Mar 21;319(5870):1665-8.
- Zhang Z, Zhang Z, Wang H, Zhang G, Hu D, Xiong J, Xiong N, Wang T, Cao X, Mao L. Proliferating cell nuclear antigen binds DNA polymerase- $\beta$  and mediates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neuronal death. *PLoS One.* 2014 Sep 3;9(9):e106669.

Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Apr;1772(4):494-502.