



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXXII

**CHAPERONI MOLECOLARI E MALATTIA DI PARKINSON:
RUOLO DI CLUSTERINA NEL PROCESSO DI
AGGREGAZIONE DI α -SINUCLEINA**

Coordinatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Stefania Conti

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Federica Maria Angela Rizzi

**Dottoranda:
Chiara Lenzi**

Anni 2016-2019

INDICE

RIASSUNTO.....	1
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 LA PROTEOSTASI CELLULARE.....	7
1.1.1 Attori dell'omeostasi proteica	7
1.1.2 La proteostasi nel citosol e nel Reticolo Endoplasmatico	15
1.2 LA PROTEOSTASI E LA MALATTIA DI PARKINSON	20
1.2.1 Cenni sulla Malattia di Parkinson.....	20
1.2.2 α -Sinucleina nella Malattia di Parkinson	25
1.3 CLUSTERINA: UNO CHAPERONE INTRA- ED EXTRA-CELLULARE	34
1.3.1 Clusterina e malattie neurodegenerative.....	38
2. SCOPO.....	41
3. MATERIALI E METODI.....	45
<i>STUDIO EX VIVO</i>	
3.1 CAMPIONI CEREBRALI UMANI	47
3.2 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE E ANALISI SIMPLE WESTERN (Peggy™)...	47
<i>STUDIO IN VITRO</i>	
3.3 MANTENIMENTO DELLA LINEA CELLULARE SH-SY5Y	49
3.4 CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI α SYN E CLONI CONTROLLO.....	49
3.5 TRATTAMENTO CON MG132	50
3.6 TRASFEZIONE CON siRNA	50
3.7 SAGGI DI VITALITÀ E PROLIFERAZIONE CELLULARE	51
3.7.1 Colorazione con Trypan blue	51
3.7.2 Saggio WST-1	51
3.7.3 Saggio cristal violetto	52

3.8 SAGGIO DI ATTIVITÀ DELLE CASPASI 3/7.....	52
3.9 ESTRAZIONE DI RNA, PREPARAZIONE cDNA E ANALISI qPCR	53
3.10 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DA COLTURE CELLULARI.....	54
3.11 SDS-PAGE E ANALISI WESTERN BLOT	55
3.12 SAGGIO DI IMMUNOCITOCHIMICA	56
3.13 CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	57

STUDIO IN VIVO

3.14 ANIMALI.....	58
3.15 GENOTIPIZZAZIONE DEGLI ANIMALI	59
3.16 TRATTAMENTO CON ROTENONE	59
3.17 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DA TESSUTO CEREBRALE DI TOPO, SDS- PAGE E ANALISI WESTERN BLOT	60
3.18 SAGGIO DI IMMUNOISTOCHEMICA	61
3.19 TEST COMPORTAMENTALI	61
3.19.1 Open Field Test	62
3.19.2 Elevated Plus Maze Test.....	62
3.19.3 Kondziela's Inverted Screen Test.....	62
3.19.4 Rotational	63
3.20 ANALISI STATISTICA	63

4. RISULTATI..... 66

STUDIO EX VIVO

4.1. LIVELLI DI CLU, α SYN e TH IN TESSUTI CEREBRALI UMANI DI PAZIENTI AFFETTI DA LBD	68
---	----

STUDIO IN VITRO

4.2 CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE SH-SY5Y SOVRAESPRESI DELLA PROTEINA α SYN.....	70
4.2.1 Trasfezione, selezione clonale, analisi dei livelli di espressione e localizzazione di α Syn	70
4.2.2 Analisi della morfologia e della proliferazione del modello cellulare	72
4.2.3 Blocco del proteasoma e induzione di stress proteotossico.....	73

4.2.4	Analisi dei marker dell'UPR	74
4.2.5	Analisi della vitalità cellulare e dell'attività delle caspasi	75
4.3	CLUSTERINA NEI CLONI SH-SY5Y SOVRAESPRIMENTI α SYN.....	77
4.3.1	Analisi dei livelli di espressione di CLU e altri chaperoni.....	77
4.3.2	Analisi immunocitochimiche di CLU e α Syn	79
4.3.3	Interazione tra CLU e α Syn.....	81
4.4.	EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI CLU IN CELLULE SH-SYN.....	82
4.4.1	Analisi dei livelli di espressione di α Syn, Hsp27, Hsp70 e Hsp90	82
4.4.2	Misura dell'UPR, della vitalità e dell'attività delle caspasi	85
4.5	EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI CLU IN CELLULE SH-SYN TRATTATE CON MG132	87
4.5.1	Analisi dei livelli di espressione di α Syn, Hsp27, Hsp70 e Hsp90	87
4.5.2	Misura dell'UPR, della vitalità e dell'attività delle caspasi	90
 <i>STUDIO IN VIVO</i>		
4.6	ESPRESSIONE DI CLU IN DIVERSE REGIONI DEL CERVELLO MURINO	92
4.7	MESSA A PUNTO DEI TEMPI DI TRATTAMENTO CON ROTENONE	93
4.8.	EFFETTI DELL'ABROGAZIONE DI CLU SULLA NEURODEGENERAZIONE INDOTTA DA ROTENONE.....	95
5.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	101
Bibliografia	110

RIASSUNTO

Un comune aspetto a molte malattie neurodegenerative è la presenza di inclusioni proteiche, costituite prevalentemente da proteine endogene mal ripiegate. Nella malattia di Parkinson (MP) e nelle altre malattie, note come malattie dei corpi di Lewy (LBD), α -Sinucleina (α Syn) costituisce la principale componente proteica delle inclusioni citoplasmatiche, definite Lewy Body (LB), che caratterizzano queste patologie. α Syn normalmente non presenta una struttura secondaria definita, mentre in condizioni patologiche adotta una conformazione a foglietto- β che si ritiene essere coinvolta o innescare eventi di aggregazione. Numerosi studi sperimentali evidenziano che il processo di aggregazione di α Syn sia un punto chiave nella patogenesi delle LBD e questo sottolinea come il mantenimento dell'omeostasi proteica sia di fondamentale importanza per garantire la corretta funzionalità cellulare. Le cellule presentano diversi sistemi di controllo qualità delle proteine e le Heat Shock Proteins (HSP) ne identificano una delle componenti principali, in quanto stabilizzano parzialmente le proteine *unfolded*, dissociano gli aggregati proteici o dirigono le proteine *misfolded* verso i sistemi di degradazione cellulare. Diverse HSP sono state ritrovate nei LB, come anche Clusterina (CLU), una glicoproteina ubiquitaria secreta che evidenzia un'attività simile a quella delle HSP. CLU è identificata come uno chaperone ATP-indipendente extra-cellulare, ma sebbene sia destinata alla secrezione, è stato dimostrato che in condizioni di elevato stress viene favorita la sua ritenzione intracellulare con localizzazione nel citosol ed in altri sub-compartimenti cellulari. È stato, dimostrato che CLU lega alcune proteine *misfolded* sia nello spazio extracellulare, sia all'interno delle cellule, e le scorta verso altri chaperoni o verso i sistemi proteolitici. Nonostante differenti studi attribuiscono a CLU un ruolo importante nel sistema di controllo della proteostasi cellulare nella malattia di Alzheimer (MA), il ruolo che svolge nella patogenesi della MP, non è ancora stato indagato, sebbene diverse evidenze sperimentali suggeriscano un suo possibile coinvolgimento anche in questa patologia. A tal proposito, lo scopo del progetto è indagare se CLU esercita un ruolo nei meccanismi di difesa cellulare attivati per contrastare gli effetti della sovrpressione di α Syn e la formazione e/o clearance degli aggregati di questa proteina. Lo studio è stato effettuato articolando l'attività sperimentale in modelli di complessità crescente, impiegando colture cellulari per la sperimentazione *in vitro*, modelli animali per la sperimentazione *in vivo* (in collaborazione con l'Università di Modena e Reggio Emilia) e includendo anche valutazioni retrospettive molecolari, eseguite presso l'Università di Oxford, su campioni di tessuto cerebrale umano appartenenti a soggetti affetti da LBD.

I dati ottenuti con questo lavoro hanno per la prima volta messo in luce un coinvolgimento di CLU nel processo di aggregazione di α Syn. Abbiamo constatato che i livelli di questo chaperone sono up-regolati già in una fase precoce e spesso asintomatica della malattia, come mostrato dalle analisi *ex vivo* e in modelli cellulari di sovr'espressione di α Syn (analisi *in vitro*). Dalle analisi è emerso, inoltre, che in cellule sovraesprimenti α Syn, prima della formazione di oligomeri ed aggregati insolubili, quando l'attivazione dell'UPR è ancora irrilevante, CLU è l'unico chaperone, tra quelli analizzati (Hsp27, Hsp70 e Hsp90), ad aumentare significativamente la propria espressione, suggerendo un ruolo specifico nel controllo del *fold*ing di α Syn. Al fine di verificare il suo ruolo in questo contesto, gli esperimenti di *loss-of-function* hanno mostrato come il silenziamento di CLU favorisca la formazione di aggregati insolubili di α Syn, anche in assenza di trattamento con MG132, un farmaco utilizzato per bloccare il proteasoma e aggravare lo stress proteotossico, senza modificare significativamente l'UPR, la sopravvivenza cellulare, l'attivazione delle caspasi o determinare un aumento compensativo del livello di espressione di nessuno degli altri chaperoni analizzati. Le prove di co-immunoprecipitazione suggeriscono, inoltre, che CLU interferisca con il processo di aggregazione di α Syn attraverso un'interazione diretta fra le due proteine.

Nell'ultima parte di questo lavoro sono stati studiati gli effetti della delezione genica di CLU in un modello murino di MP indotto da neurotossine. I risultati evidenziano che gli animali C57Bl/6^{CLU^{-/-}} (CLU-KO) hanno comportamento locomotorio, attitudine esplorativa e forza muscolare paragonabile rispetto ai fratelli di lettiera che esprimono normali livelli di proteina C57Bl/6^{CLU^{+/+}} (WT). L'estensione della neurodegenerazione indotta da iniezione unilaterale stereotassica intracranica di rotenone è stata inferiore al 50%, sia in animali WT e CLU-KO, con livelli individuali estremamente variabili, probabilmente correlabili alla scarsa riproducibilità della procedura di iniezione stereotassica. Inoltre, la sola iniezione di veicolo ha indotto livelli di neurodegenerazione paragonabili al farmaco negli animali CLU-KO ma non nei WT. Tutto questo ha reso impossibile misurare differenze statisticamente significative negli effetti causati dal trattamento e dal genotipo sulla neurodegenerazione. Non di meno, il fatto che il solo veicolo abbia determinato neurodegenerazione negli animali CLU-KO, unitamente al risultato del test di lateralizzazione, suggerisce un possibile ruolo neuroprotettivo per CLU.

Il coinvolgimento di CLU nel processo di aggregazione di α Syn dimostrato in questo lavoro di tesi, rappresenta un punto di partenza per il consolidamento di nuove conoscenze potenzialmente utili allo sviluppo di strategie farmacologiche mirate a contrastare

l'alterazione dell'equilibrio della proteostasi, evento precoce e comune delle malattie da *misfolding*.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA PROTEOSTASI CELLULARE

Il mantenimento della proteostasi, detta anche omeostasi proteica, è una delle sfide più importanti della cellula volte a garantire la sua corretta funzionalità. Per proteostasi si intende quel complesso network che mira al controllo della sintesi, della conformazione, della concentrazione e della localizzazione delle singole proteine che compongono il proteoma¹. Quando le proteine sono piegate correttamente, e raggiungono la loro conformazione nativa, le regioni idrofobe del polipeptide sono nascoste all'interno della struttura al fine di mantenere il più basso stato energetico possibile². Errori nella trascrizione o nella traduzione, come una sostituzione di amminoacidi, e condizioni ambientali, come lo stress ossidativo e valori estremi di pH e temperatura, possono destabilizzare il normale ripiegamento, provocando l'esposizione delle regioni idrofobiche. Poiché tali regioni sono in grado di interagire e sequestrare altre proteine, favoriscono la formazione di varie strutture stabili tra cui aggregati solubili e depositi insolubili^{3,4} che determinano nella maggior parte dei casi malfunzionamenti in diverse vie cellulari. Ne deriva, quindi, come il corretto ripiegamento delle proteine è essenziale per la corretta funzionalità della cellula.

1.1.1 Attori della proteostasi

Nella cellula, oltre all'aggregazione, le proteine mal ripiegate possono andare incontro a due diversi destini: il rimodellamento e la degradazione, meccanismi sviluppati per garantire il mantenimento della proteostasi⁵. Il sistema di controllo di qualità delle proteine è costituito da molteplici pathway presenti in compartimenti cellulari diversi, come il citosol, il Reticolo Endoplasmatico (RE), il mitocondrio e il nucleo, che comunicano fra loro e influenzano a vicenda l'omeostasi proteica. I principali attori di questo network sono gli chaperoni molecolari e due sistemi proteolitici, il sistema ubiquitina-proteasoma e la via autofagica.

Chaperoni molecolari

Gli chaperoni molecolari costituiscono la prima linea di difesa contro le proteine mal ripiegate, infatti il loro compito è quello di assistere, da soli o in associazione con co-chaperoni, il folding delle proteine di nuova sintesi, la loro traslocazione attraverso le membrane, oltre che di mediare il processo di re-folding delle proteine mal ripiegate o di interferire con il loro processo di aggregazione. Gli chaperoni molecolari hanno, inoltre, un ruolo nell'indirizzare le proteine mal ripiegate verso i sistemi di degradazione; tuttavia, la base molecolare con cui gli chaperoni decidono se ripiegare una proteina *misfolded* o indirizzarla al sistema di degradazione non è ancora del tutto chiara. Gli chaperoni possono,

quindi, contribuire alla scelta del destino della proteina fattori come la disponibilità complessiva di chaperoni o il contenuto di ATP cellulare, data la necessità dell'idrolisi di ATP per il legame e il rilascio del substrato da parte degli chaperoni. Esistono diverse famiglie di chaperoni, generalmente classificate in base alle loro masse molecolari, tra le più importanti la famiglia delle Hsp70, delle Hsp90 e delle small HSP (sHSP)⁶⁻⁸. Sebbene siano state definite come proteine indotte da stress termico (Heat Shock Proteins, HSP) è oramai noto che la loro espressione è indotta anche da altre forme di stress, che includono lo stress proteotossico⁶.

I membri della famiglia delle Hsp70 rappresentano gli chaperoni molecolari maggiormente conservati. La famiglia delle Hsp70 umane è costituita da 13 diverse proteine divise fra Hsp70, forme stress-inducibili, e Hsc70, forme costitutivamente espresse. Le Hsp70 presentano due domini funzionali: un dominio ATPasico N-terminale in grado di legare nucleotidi (NBD) e un dominio C-terminale che lega le regioni idrofobiche dei peptidi-substrato (SBD) (*Figura 1.1 A*). Il legame dell'ATP all'NBD stabilizza lo stato aperto dell'Hsp70, facilitando il legame del substrato al SBD. L'idrolisi dell'ATP, nella maggior parte dei casi mediata dai co-chaperoni, induce l'Hsp70 ad assumere una conformazione chiusa fondamentale per favorire il re-folding del peptide, mentre il legame di una nuova molecola di ATP all' NBD riporta l'Hsp70 ad assumere una conformazione aperta con conseguente rilascio del substrato. Sono necessari continui cicli di legame e rilascio del polipeptide per il suo refolding, finché questo non esporrà più la regione idrofobica e sarà quindi correttamente ripiegato⁶. Tuttavia, spesso dopo cicli ripetuti ma inefficienti, il peptide viene trasferito a chaperoni diversi o indirizzato al sistema di degradazione⁷ (*Figura 1.1 B*). Poiché l'attività ATPasica delle Hsp70 è relativamente bassa e poiché una corretta regolazione dei cicli ATPasici è cruciale per la sua efficienza, il legame e l'idrolisi dell'ATP sono regolati da co-chaperoni. Ad esempio, le Hsp40 di classe III promuovono l'idrolisi dell'ATP e quindi favoriscono il legame delle Hsp70 con il substrato, mentre i fattori di scambio nucleotidico, come BAG-1 o i membri della famiglia delle Hsp110 catalizzano il rilascio di ADP e il legame di una nuova molecola di ATP⁹. Contrariamente, un altro co-chaperone, CHIP (C-terminus of heat-shock cognate 70 stress protein-interacting protein) si lega alle Hsp70 e ne riduce la loro attività¹⁰. CHIP, infatti, ha un'attività di ubiquitina-ligasi-E3 e selettivamente, in co-operazione con altri chaperoni, va ad ubiquitinare le proteine mal ripiegate promuovendo la loro degradazione mediante il sistema ubiquitina-proteasoma. Le Hsp70 agiscono a diversi livelli del sistema di controllo qualità delle proteine, come nel

folding di polipeptidi nascenti, nel re-folding di proteine denaturate da stress, nel trasporto e traslocazione di membrana e infine nell'indirizzare le proteine ai sistemi di degradazione⁷.

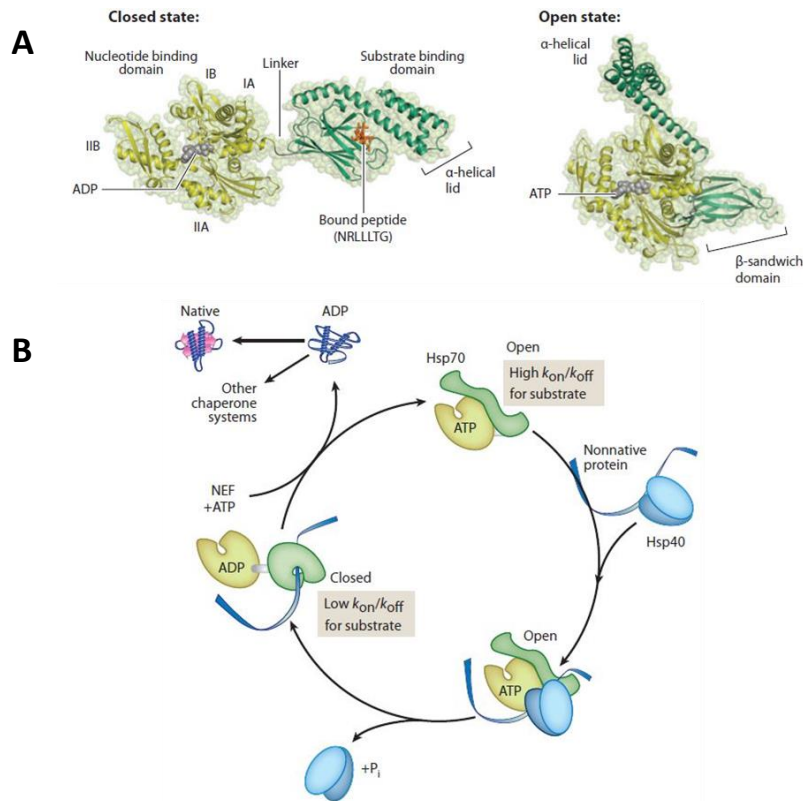


Figura 1.1: Struttura e meccanismo d'azione delle Hsp70.

(A) Struttura dell'Hsp70 relativa alla conformazione aperta e chiusa. (B) Meccanismo di azione dell'Hsp70 (Kimet al, 2013).

La famiglia delle Hsp90 è costituita da cinque membri presenti in differenti compartimenti cellulari come il citosol, il RE e il mitocondrio. Nel citosol sono presenti due forme, la forma costitutivamente espressa e quella inducibile in seguito a stress⁶. Le Hsp90 presentano una struttura dimerica e sono costituite da tre domini: il dominio N-terminale, che contiene il sito di legame all'ATP, il dominio centrale, fondamentale per l'interazione con le proteine-substrato e per la regolazione dell'idrolisi di ATP e il dominio C-terminale contenente il sito di interazione per l'assemblaggio del dimero e una sequenza motivo (MEEVD) che media l'interazione con altri co-chaperoni (Figura 1.2 A). Nonostante il meccanismo di azione dell'Hsp90 non sia stato del tutto compreso, è stato dimostrato che anche per questa classe di HSP i cambiamenti strutturali sono regolati dal legame con l'ATP e con co-chaperoni, come Aha1 e CdC37 che regolano l'idrolisi di ATP e p23 che, legando il dominio N-terminale, regola la dissociazione del substrato e presumibilmente stabilizza il legame tra Hsp90 e ATP⁷ (Figura 1.2 B). La funzione principale delle Hsp90 è di sopprimere l'aggregazione andando

proprio a disaggregare gli aggregati di proteine mal ripiegate e a migliorarne il ripiegamento^{6,7}. È stato, inoltre, riconosciuto un ruolo nel pathway di attivazione dell'Heat Shock Factor 1 (HSF-1), fattore trascrizionale che regola l'espressione delle HSP¹¹.

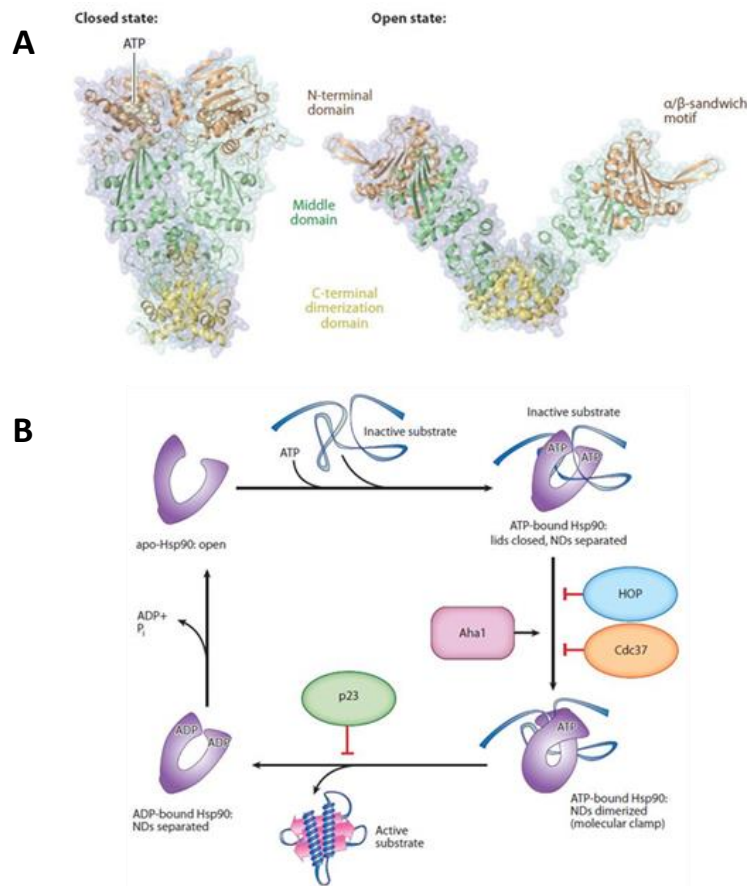


Figura 1.2: Struttura e meccanismo d'azione delle Hsp90.

(A) Struttura dell'Hsp90 relativa alla conformazione aperta e chiusa. (B) Meccanismo di azione proposto per l'Hsp90 (Ki et al, 2013).

Le sHSP, i cui pesi molecolari sono compresi tra i 16 e 40 kDa, sono caratterizzate da un dominio C-terminale altamente conservato e fosforilato sui residui di serine. Seppur di piccole dimensioni, le sHSP possono assemblarsi fra loro al fine di costituire complessi fino a circa 700 kDa. La famiglia delle sHSP è composta da almeno 10 membri e quelli più studiati sono l'Hsp27, l' α A-cristallina e l' α B-cristallina. Sia l'Hsp27 che l' α B-cristallina sono espresse costitutivamente in una varietà di tessuti, tuttavia la loro espressione è sovraregolata in diverse condizioni di stress⁶. Le sHsp hanno la capacità di mantenere solubili proteine parzialmente misfoldate attraverso il legame diretto, schermando così i loro amminoacidi idrofobici esposti in superficie. Evidenze mostrano che le sHSP destabilizzano gli aggregati, promuovendo la loro solubilizzazione e facilitando il corretto ripiegamento o degradazione.

Come la maggior parte delle HSP, svolgono la loro attività in maniera ATP dipendente; tuttavia in estreme condizioni di stress, non appena il livello dell'ATP nelle cellule si riduce, le sHSP agiscono in maniera indipendente dall'ATP legandosi alle proteine mal ripiegate al fine di impedire l'interazione con altre proteine. Quando il livello di ATP è stato ripristinato, le proteine sequestrate dalle sHSP possono essere trasferite su un chaperone che ne media il ripiegamento o la degradazione mediante idrolisi di ATP⁶.

Sistema ubiquitina-proteasoma

Quando la conformazione delle proteine non può essere ripristinata dal refolding mediato da chaperoni, questi ultimi le reindirizzano verso il sistema di degradazione ubiquitina-proteasoma. Il processo di degradazione inizia con l'aggiunta di catene di poliubiquitina ai residui di lisina delle proteine da degradare attraverso l'attività a cascata di tre enzimi: l'enzima ATP-dipendente di attivazione dell'ubiquitina (E1), gli enzimi di coniugazione dell'ubiquitina (E2) e gli enzimi ubiquitina-proteina ligasi (E3). Una volta ubiquitinate, i complessi chaperone-cochaperone indirizzano le proteine verso il proteasoma^{12,13}. Il proteasoma è grande complesso multi-subunità (26S) costituiti da due domini regolatori ATPasici (19S) e da un nucleo proteolitico (20S)¹⁴ (*Figura 1.3*). Uno dei due complessi 19S rappresenta la base del proteasoma, ed è costituito da unità ATPasiche (Rpn1-5) e non-ATPasiche (Rpn1, Rpn2, Rpn10 e Rpn13), l'altro complesso costituisce il coperchio ed è composto esclusivamente da proteine non-ATPasiche (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11 e Rpn12). Le proteine Rpn sono coinvolte nel processo di riconoscimento e rimozione dell'ubiquitina e nel processo di denaturazione della proteina per facilitarne l'ingresso nel canale del sito catalitico^{15,16}. Il complesso catalitico 20S è il sito in cui avviene la degradazione del peptide e presenta una struttura cilindrica derivante dall'assemblaggio di anelli più esterni, ciascuno composto da sette diverse subunità α , e due anelli interni composti da sette subunità β . Solo 3 delle 7 subunità β svolgono l'attività catalitica, in particolare la subunità β 1 presenta una attività caspatica e quindi taglia dopo amminoacidi acidi, la subunità β 2 ha un'attività triptica, ossia rimuove amminoacidi basici e infine la subunità β 5 possiede attività chimotriptica in quanto agisce sugli amminoacidi idrofobici^{17,18}. Nonostante la loro localizzazione citosolica e nucleare, i proteasomi costituiscono una componente importante per il processo di degradazione associato al RE (ERAD).

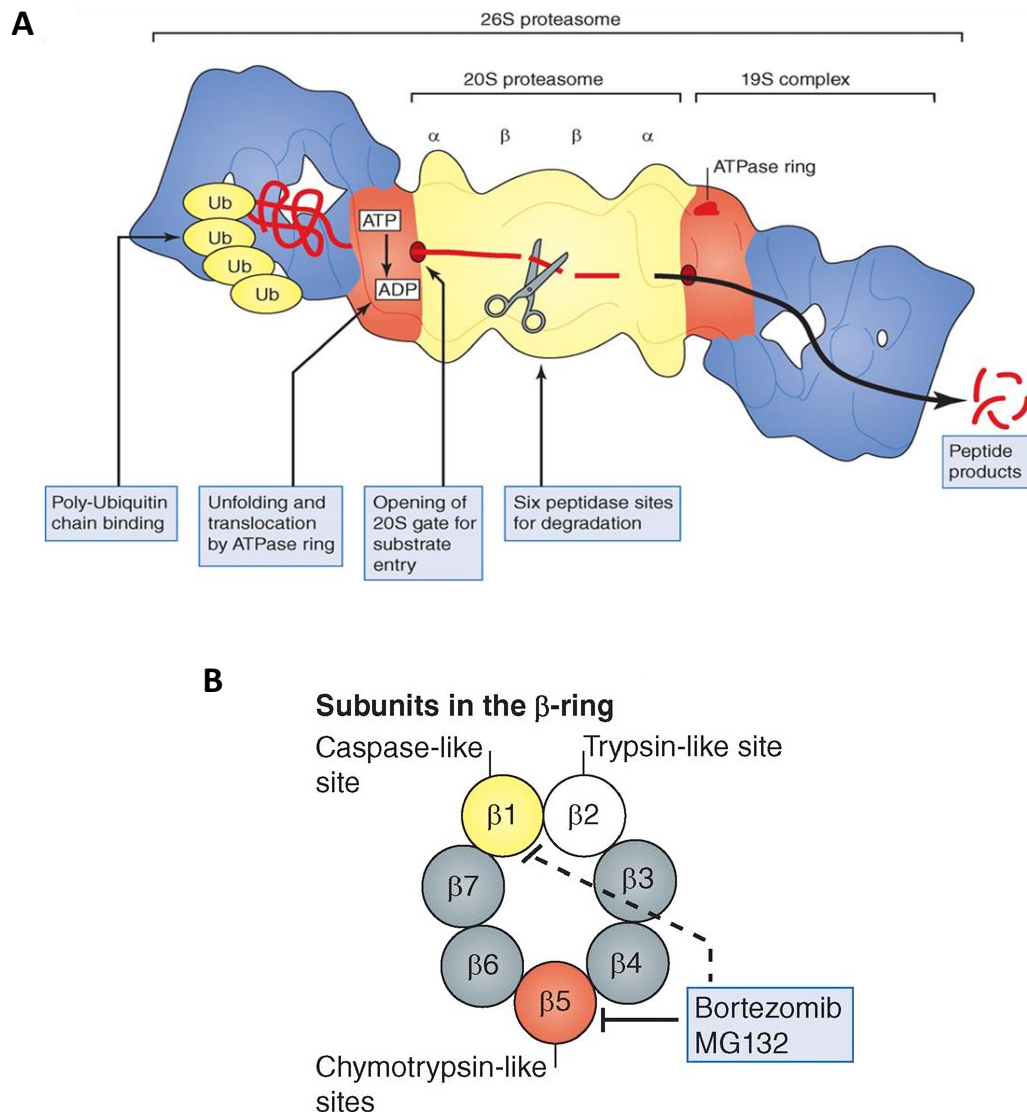


Figura 1.3: Struttura del proteasoma.

(A) Struttura e funzione delle componenti del proteasoma 26S. (B) Organizzazione delle subunità β del complesso 20S e sito di azione dei farmaci in grado di inibire l'attività del proteasoma (Goldeberg et al, 2008).

Via autofagica

Sebbene il proteasoma sia la prima fonte di degradazione delle proteine nella cellula, i limiti biofisici del poro centrale del nucleo 20S non consentono la degradazione di complessi proteici di grandi dimensioni. I substrati più voluminosi, come grandi inclusioni, possono essere diretti verso il lisosoma, un organello contenente una serie di proteasi non specifiche in grado di degradare una vasta gamma di substrati, mediante un processo definito autofagia. La

via autofagica è caratterizzata da 3 meccanismi diversi^{19,20}: la macroautofagia, la microautofagia e l'autofagia mediata da chaperone (CMA) (Figura 1.4).

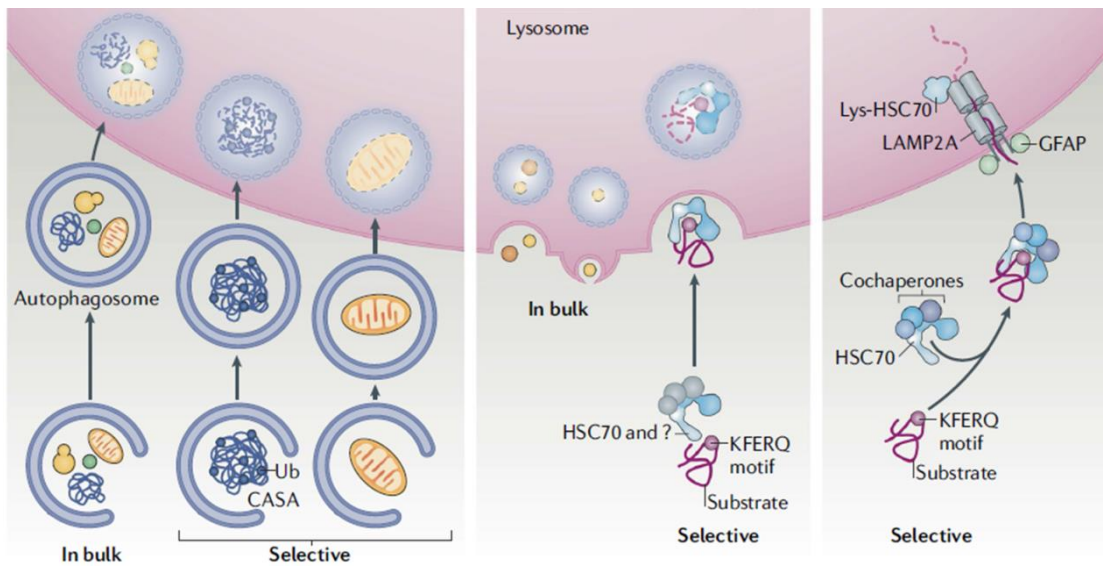


Figura 1.4: Autofagia.

Pathway della macroautofagia (A), microautofagia, (B) e CMA (C) (Modificata da Kaushik et al, 2018).

La macroautofagia è la forma più studiata e comporta il sequestro non selettivo di organelli o regioni del citosol nell'autofagosoma, una struttura vescicolare a doppia membrana.

Il processo ha inizio con una fase di nucleazione del fagoforo, mediata dal complesso ULK e PI3KCIII. Questa fase prevede la formazione di una membrana in grado di inglobare i substrati destinati alla degradazione. Nella successiva fase di allungamento, la membrana si allunga fino a formare l'autofagosoma. In fase di maturazione, l'autofagosoma può fondersi con gli endosomi formando una vescicola intermedia (anfisioma), che fondendosi a sua volta con il lisosoma genera l'autolisosoma; qui le componenti citosoliche sequestrate vengono degradate e le macromolecole che ne derivano restituite al citoplasma per poter essere riutilizzate per la sintesi di ATP o per l'anabolismo cellulare²¹. L'autofagia è un processo strettamente regolato e la sua induzione è dovuta ad una regolazione trascrizionale a lungo termine e/o a modificazioni traduzionali, rispettivamente di geni e proteine coinvolti in questo meccanismo. La regolazione del complesso ULK avviene mediante il pathway del complesso 1 del bersaglio della rapamicina nel mammifero (mTORC1) e il pathway della chinasi attivata dall'adenosina monofosfato (AMPK). Sia mTORC1 che AMPK sono riconosciuti come sensori energetici e per questo attivati rispettivamente da una carenza di nutrienti e da una carenza di ATP (aumento del rapporto AMP/ATP). L'assemblaggio del complesso PI3KCIII,

invece, è regolato da una serie di proteine che agiscono come inibitori (e.g Bcl-2 e Bcl-XL) o attivatori della formazione del complesso stesso (e.g Atg14 e Ambra-1)²⁰.

Contrariamente a quanto avviene per la macroautofagia, la microautofagia è caratterizzata dall'assunzione diretta nel lisosoma, mediante invaginazione della membrana, di materiale di rifiuto dal citosol. In seguito all'invaginazione, si formano piccole vescicole all'interno del lisosoma contenenti le sezioni del citoplasma che saranno degradate, grazie a specifiche proteasi lisosomiali²².

La CMA, invece, si verifica attraverso il rilascio, mediato dall' Hsc70, di proteine nel lisosoma¹⁹. Solo le proteine con un pentapeptide C-terminale (KFERQ) sono riconosciute dall' Hsc70. Il legame dell'Hsc70 permette alla proteina di assumere una conformazione spiegata così da favorire la sua traslocazione nel lisosoma. Quando il complesso chaperone-substrato interagisce con il recettore lisosomiale LAMP-2A (Lysosome-associated membrane protein 2), si ha un cambio conformazionale di quest'ultimo che dimerizzando permette l'ingresso del substrato e quindi la sua degradazione. A seguito di tale processo, LAMP-2A si disassembla e i suoi monomeri vengono degradati in microdomini lipidici²³.

Nonostante l'autofagia sia costitutivamente attiva nelle cellule, viene fortemente indotta da situazioni in cui si manifestano deprivazione di nutrienti o fattori di crescita, stress ossidativo, ipossia, etc. In queste condizioni, l'autofagia agisce al fine di mediare il ripristino della proteostasi cellulare tramite la degradazione di organelli danneggiati, lo smaltimento di proteine anomale e/o aggregate, il mantenimento della produzione di ATP e il riciclo degli amminoacidi. Diverse evidenze, tuttavia, suggeriscono un suo ruolo anche in un processo di morte cellulare caspasi-indipendente, definito, appunto, come morte cellulare programmata di tipo II o legata all'autofagia²⁴.

1.1.2 La proteostasi nel citosol e nel Reticolo Endoplasmatico

Poiché il processo traduzionale avviene in due regioni della cellula, nel citosol e nel RE, il sistema di controllo della qualità delle proteine intracellulari è attribuibile principalmente ai pathway che si sviluppano in questi due compartimenti e al loro *cross-talk*.

Il sistema di controllo qualità nel citosol

Il sistema di controllo qualità nel citosol è principalmente mediato dall'attività degli chaperoni, che come già detto decidono il destino delle proteine. In condizioni normali, data l'elevata complessità della struttura proteica, uno dei modi più diretti per una cellula di evitare l'accumulo di proteine danneggiate è controllare e regolare il processo di *folding* già a livello co-traduzionale. Il *folding* co-traduzionale dei lunghi polipeptidi aiuta a prevenire la formazione di intermedi mal ripiegati che potrebbero altrimenti compromettere la capacità della proteina di raggiungere il suo stato nativo²⁵. Negli eucarioti, è assistito dal legame degli chaperoni, come le Hsp70 o Hsp40, alla catena nascente²⁶. È importante sottolineare che, le catene nascenti competono con le proteine mal ripiegate nel citosol per il legame con gli chaperoni, e quindi eventi nella cellula che provocano un accumulo di proteine mal ripiegate influenzano il *folding* co-traduzionale, innescando un circolo vizioso. In aggiunta a tale meccanismo di regolazione, è stato dimostrato come fino al 15% di catene polipeptidiche nascenti possa essere etichettato per la degradazione mediata dal proteasoma, anche in questo caso già a livello co-traduzionale^{27,28}.

In caso di stress, di qualsiasi origine e ancor più se dovuto ad accumuli di proteine mal ripiegate a livello del citosol, si ha una risposta cellulare, conosciuta con il nome di Heat Shock Response (HSR) e mediata dal fattore di trascrizione Heat Shock Factor 1 (HSF-1), costitutivamente espresso nella maggior parte dei tessuti.

In assenza di stress, l'HSF-1 si trova in una forma monomerica, inattiva e quindi non in grado di legare il DNA. In condizioni di stress, l'HSF-1 viene rapidamente convertito nella sua forma attiva in grado di associarsi al DNA, attraverso un percorso a più fasi che prevede la transizione da monomero a trimero, la traslocazione nel nucleo e l'aggiunta di modifiche post-traduzionali. Una volta nel nucleo l'HSF-1 lega il DNA in corrispondenza degli Heat Shock Elements (HSE) e media la trascrizione di chaperoni e co-chaperoni, al fine di permettere la regolazione del folding proteico; dell'ubiquitina per rendere pronto il sistema di degradazione delle proteine mediato dal proteasoma e di molti fattori di regolazione trascrizionale e traduzionale, al fine di promuovere l'espressione di proteine utili al controllo dell'omeostasi e ridurre la sintesi di altre proteine (*Figura 1.5*)²⁹.

I segnali che attivano l'HSF-1 sono di varie origini (stress proteotossico, ipertermia o ipotermia, stress ossidativo, infezioni batteriche o virali) e nonostante il suo ruolo sia ben accertato, molti aspetti su come risente qualitativamente e quantitativamente delle differenti forme di stress non sono stati ancora del tutto compresi. Sebbene i segnali che portano all'attivazione dell'HSF-1 possono essere differenti in natura, uno dei più frequenti è l'aumento dei livelli di proteine *unfolded* o *misfolded*^{30,31}.

In condizioni normali, infatti, la forma monomerica dell'HSF-1 interagisce con lo chaperone Hsp90^{11,32}, tuttavia questa interazione è rapidamente interrotta in presenza di stress proteotossico, l'Hsp90 mantiene quindi l'HSF-1 in uno stato inattivo^{11,33}. In effetti, l'inibizione farmacologica dell'attività dell'Hsp90 è sufficiente a convertire l'HSF-1 nella forma trimerica attiva. Queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare che l'aumento di proteine mal ripiegate funge da innesco per liberare l'HSF-1 dall'Hsp90, consentendone l'attivazione^{29,34}. Tuttavia, la regolazione mediata dall'Hsp90, sembra non essere circoscritta alla forma monomerica ma si pensa possa avvenire anche a livello della forma trimerica.

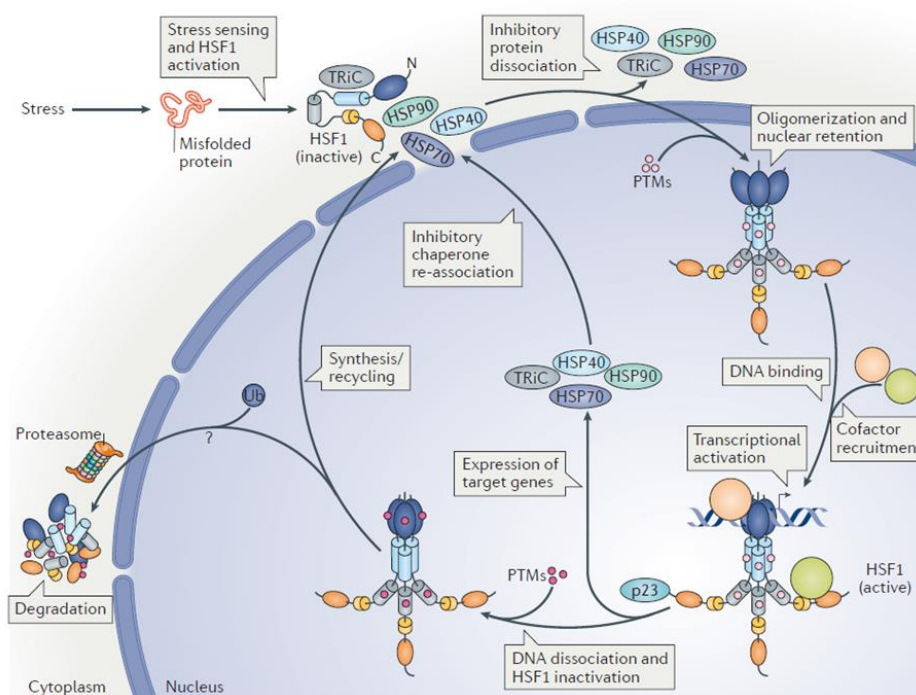


Figura 1.5: Meccanismo di azione dell'HSF-1 in risposta allo stress.

L'HSF-1 in presenza di stimoli stressogeni subisce un processo di attivazione caratterizzato da più fasi. (Gomez-Pastor et al, 2018).

Il sistema di controllo qualità nel RE

Il RE è il sito principale della biosintesi di proteine secrete e di membrana, di steroidi, del colesterolo e di altri lipidi, ed ha inoltre un ruolo nello stoccaggio e nei pathway di segnalazione del calcio. Dal momento che nel RE avvengono importanti eventi come il *folding* e le modifiche post-traduzionali, vi è la necessità di avere sistemi di regolazione e controllo qualità delle proteine anche in questo organello. Così come nel citosol, anche le proteine nascenti traslocate nel lume del RE, subiscono un processo di *folding* co-traduzionale e post-traduzionale regolato da interazioni specifiche e sequenziali con chaperoni. In questo contesto gli chaperoni svolgono diversi e specifici ruoli, tra cui catalizzare reazioni di isomerizzazione, prevenire il transito delle proteine luminali attraverso la via secretoria e regolare la retro-traslocazione delle proteine mal ripiegate per la degradazione. Cambiamenti nell'omeostasi del calcio, presenza di inibitori delle modificazioni post traduzionali, infezione da virus, ipossia o sovraccarico traduzionale possono portare ad alterazioni dei meccanismi sopracitati, determinando uno squilibrio tra la sintesi di nuove proteine e la capacità del RE di processarle. Questo squilibrio innesca una situazione di forte stress³⁵ nei confronti della quale il RE risponde mediante l'*Unfolded Protein Response* (UPR), il sistema di controllo qualità delle proteine di questo organello. L'UPR può essere presentato come un'interazione coordinata di tre percorsi distinti, ciascuno dei quali media la trasmissione delle informazioni tra RE e citosol attraverso i recettori transmembrana, PERK, IRE1 e ATF³⁶. Ognuno di questi tre recettori innesca una via di trasduzione del segnale che culmina o con la riduzione della sintesi delle proteine al fine di ridurre il carico proteico (via di PERK) o con l'induzione dei sistemi volti ad assistere il refolding o la degradazione delle proteine (via di IRE1 o ATF6). L'attivazione di queste tre vie avviene grazie allo chaperone BiP (appartenente alla famiglia delle Hsp70) che rimane legato nel lume del RE ai suddetti recettori fino a quando il livello di proteine mal ripiegate nel RE non supera una determinata soglia, oltre la quale BiP si dissocia dai recettori e si lega alle proteine, determinando così l'attivazione dell'UPR²⁵.

Nella via di PERK, a seguito della dissociazione BiP, il recettore dimerizza e si autofosforila, attivandosi. Grazie alla sua attività chinastica, PERK fosforila il fattore eIF2a, al fine di bloccare la fase iniziale della traduzione. Sebbene nel complesso i livelli di sintesi proteica globale siano ridotti, un certo numero di mRNA specifici è comunque tradotto. Uno di questi mRNA codifica per il fattore di trascrizione ATF4 che up-regola le proteine fondamentali per il ripristino dell'omeostasi cellulare, come chaperoni e proteine del RE coinvolte nel metabolismo degli aminoacidi e nel controllo redox. ATF4 up-regola anche GADD34, la subunità inducibile della proteina fosfatasi 1 (PP1) che promuove la de-fosforilazione di

eIF2a, fornendo così un meccanismo di feedback negativo volto a limitare l'inibizione della sintesi proteica. Se lo stress del reticolo endoplasmatico è prolungato ATF4 è in grado di up-regolare il fattore pro-apoptotico CHOP (C/EBP homologous protein), che innesca la cascata di segnalazione della morte apoptotica³⁷ (Figura 1.6).

Il recettore IRE1 α attivato, invece, grazie alla sua attività endoribonucleasica, media lo splicing di XBP-1, un fattore di trascrizione che regola l'espressione di una vasta gamma di geni codificanti per chaperoni molecolari, come BiP, calreticulina e calnexin; per le proteine disolfuro isomerasi (PDI) e per le proteine HRD-1 e SEL-1, coinvolte nel sistema ERAD. Oltre all'attivazione di XBP-1, IRE1 può direttamente degradare gli mRNA destinati all'inserimento co-traduzionale nel RE, al fine di ridurre il carico di nuove proteine da sintetizzare²⁵ (Figura 1.6).

La terza via dell'UPR è mediata dal recettore ATF6, un fattore di trascrizione transmembrana, che quando attivato viene traslocato nell'apparato del Golgi, dove subisce un taglio proteolitico mediato da S1P e S2P, due proteasi specifiche di questo compartimento cellulare (proteasi del sito 1 e del sito 2)³⁸. Il taglio permette il rilascio e la traslocazione del dominio N-terminale citoplasmatico di ATF6 nel nucleo, dove attiva la trascrizione di geni target dell'UPR, come Bip, GRP94 e PDI, al fine di ripristinare la proteostasi nel RE (Figura 1.6).

È importante sottolineare che se la quantità di proteine mal ripiegate nell'RE supera la capacità dell'UPR di ripristinare l'omeostasi, viene attivato l'ERAD ossia il processo di retro-traslocazione nel citosol delle proteine non correttamente ripiegate e destinate alla degradazione mediata dal proteasoma³⁹. Il sistema di controllo proteico a livello del citoplasma è attivo anche sul pool di proteine non ripiegate derivanti dal RE e può essere messo in crisi da esse. Viceversa, è stato dimostrato che anche il pool di proteine citosoliche mal ripiegate possa indurre lo stress del RE⁴⁰ sequestrando, ad esempio, la proteina citosolica p97 che regola la traslocazione delle proteine dal RE al citosol⁴¹, o interferendo con la traslocazione di ATF6 nel Golgi⁴², o anche entrando direttamente nel lume del RE⁴³. Studi hanno provato che tutti questi meccanismi si sviluppano quando le proteine, seppur mal foldate o presenti in piccoli aggregati, sono ancora in uno stato solubile, mentre si riducono quando le proteine mal foldate precipitano in aggregati proteici insolubili, sottolineando come le grandi inclusioni citoplasmatiche possano avere un ruolo protettivo nei confronti della cellula^{41,44}. Tutte queste evidenze mostrano come l'HSR e l'UPR siano connessi fra loro e possano influenzarsi a vicenda sia positivamente che negativamente, in base alle condizioni in cui la cellula si ritrova in quel particolare momento.

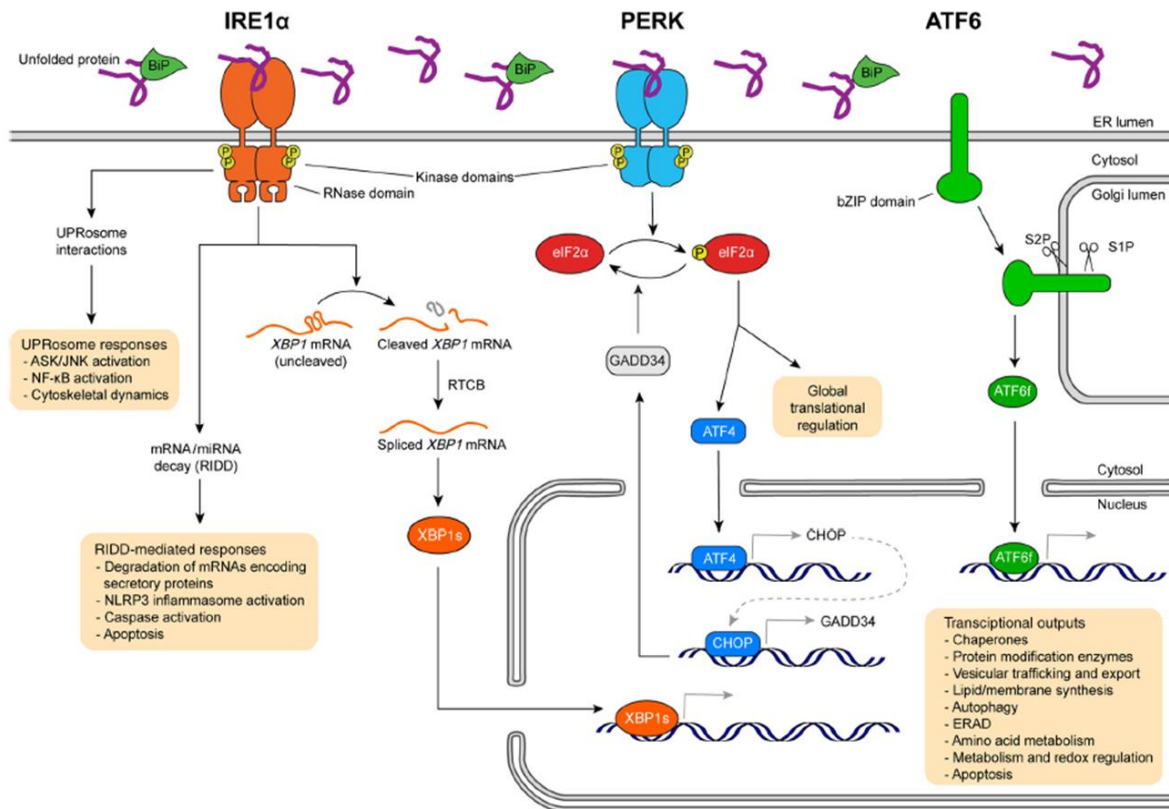


Figura 1.6: Fattori dell'UPR.

Meccanismo di azione della via di Ire1 α , PERK e ATF6 nell'UPR (Gonzalez-Teuber et al, 2018).

1.2 LA PROTEOSTASI E LA MALATTIA DI PARKINSON

La situazione in cui una proteina non presenta il corretto folding e forma aggregati determina una perdita di funzione della proteina stessa e/o l'acquisizione di una funzione tossica, compromettendo, in entrambi i casi, il suo corretto funzionamento e determinando, nella maggior parte dei casi la comparsa di patologie⁴, meglio definite come malattie da misfolding o proteinopatie.

Le malattie neurodegenerative, come ad esempio la Malattia di Parkinson (MP), la Malattia di Alzheimer (MA), la Malattia di Huntington (MH) e le Malattie Prioniche (MPr), rientrano nel gruppo delle proteinopatie perché sono principalmente caratterizzate da massicci depositi di aggregati proteici determinati dalla produzione anomala o dalla sovraespressione di proteine specifiche, come α -Sinucleina (α Syn) per la MP, tau e il β -amiloide per la MA, l'huntingtina per la MH e i prioni per le encefalopatie spongiformi⁴⁵. In questo capitolo l'attenzione sarà focalizzata sulla MP.

1.2.1 Cenni sulla Malattia di Parkinson

La MP è la seconda patologia neurodegenerativa più comune dopo la MA⁴⁶ ed è dovuta ad una degenerazione cronica e progressiva di neuroni dopaminergici presenti nella *Substantia Nigra pars compacta (SNpc)*⁴⁷. Tale degenerazione è in grado di determinare una riduzione dei livelli di dopamina, il neurotrasmettitore principale per l'attivazione del circuito che regola il movimento. Il marker patologico della MP è la presenza di inclusioni citoplasmatiche proteiche note con il nome di corpi e neuriti di Lewy (LB)⁴⁷, localizzate sia a livello del sistema nervoso centrale che periferico. La presenza di LB in soggetti affetti da MP, fa rientrare questa patologia nella classe di malattie neurodegenerative definite Lewy Bodies Disease (LBD), poiché tutte caratterizzate dalla presenza di queste grandi inclusioni citoplasmatiche.

Epidemiologia ed eziologia

La MP è diffusa in tutto il mondo, tuttavia differenze si riscontrano tra diverse etnie, probabilmente in relazione a fattori ambientali o suscettibilità genetica. La MP è una malattia che colpisce entrambi i sessi, anche se il rischio di contrarla nel corso della vita è del 2% per gli uomini e del 1,3% per le donne, le ragioni di questa differenza non sono chiare, ma alcuni la attribuiscono all'effetto protettivo esercitato dagli estrogeni nelle donne^{46,48}. Secondo una recente revisione sistematica della letteratura nel 2016 erano affetti da MP 6,1 milioni di individui nel mondo, di cui il 47,5% donne ed il 52,5% uomini. È stato stimato che il numero

di individui con MP nel 2016 era 2,4 volte più alto rispetto al 1999⁴⁹ e raggiungerà nel 2030 un numero pari a 9 milioni al mondo⁴⁶. La prevalenza della MP è compresa tra 100 e 200 casi su 100.000 persone, mentre l'incidenza annuale è di circa 15 casi per 100.000 persone. Si stima che in Italia le persone affette da MP siano circa 230.000; con una prevalenza della malattia pari all'1-2% della popolazione sopra i 60 anni e al 3-5% della popolazione sopra gli 85 anni (Ministero della Salute, 2013). L'impatto economico che questa patologia invalidante ha sulla nostra società è in continuo aumento; è stato stimato un costo a carico del Sistema Sanitario Europeo pari a 13,9 miliardi/anno⁴⁶. Il manifestarsi della patologia aumenta con l'età e generalmente viene diagnosticata in una fascia d'età compresa tra i 65 e 70 anni, mentre la diagnosi prima dei 40 anni si osserva in meno del 5% dei casi⁵⁰.

L'età quindi rappresenta il principale fattore di rischio per l'insorgenza della MP e solo il 5-10% dei casi è imputabile a fattori genetici, la maggior parte dei quali ne determina un esordio precoce (prima dei 40 anni)^{46,50,51}. Anche se l'età è il fattore che influenza maggiormente il rischio di sviluppare questa patologia, si ritiene che la sua origine sia multifattoriale, ovvero dovuta sia a fattori ereditari sia ambientali, come esposizione a sostanze tossiche e ad agenti patogeni o a determinati stili di vita. Sebbene i fattori ambientali risultino più importanti della predisposizione genetica⁵², sono stati identificati, mediante studi di linkage, diversi loci (PARK) e geni correlati a forme ereditarie autosomiche dominanti o recessive della MP (*Tabella 1.1*)⁵³.

Locus	Gene	Inheritance	Onset	Location	Variants	Function
PARK1/4	SNCA	Dominant Risk factor	EO	4q21.3-q22	5 point mutations, multiplications Rep1 risk variant in the promoter	Synaptic vesicles trafficking
PARK2	PARKIN	Recessive	EO	6q25.2-q27	>250 point mutation, ins/de and exon rearrangements	Mitophagy
PARK3	Unknown	Dominant	LO	2p13	?	?
PARK5	UCHL1	Dominant	LO	4p13	1 missense variant in one sibling pair	Proteasome
PARK6	PINK1	Recessive	EO	1p36.12	> 100 point mutations, ins/del and exon rearrangements	Mitophagy
PARK7	DJ-1	Recessive	EO	1p36.23	>20 point mutations and deletions	Mitophagy
PARK8	LRRK2	Dominant Risk factor	LO	12q12	7 point mutations Risk variants p.R1628P and p.G2385R	Autophagy?
PARK9	ATP13A2	Recessive	EO	1p36	>20 point mutations	Lysosomes
PARK10	Unknown	Risk factor	?	1p32	?	?
PARK11	GIGYF2	Recessive	EO	2q36-7	7 missense variants	Insulin-like growth factors (IGFs) signaling
PARK12	Unknown	Risk factor	?	Xq21-q22	?	?
PARK13	HTRA2	Dominant	?	2p13.1	1 missense variant	Mitophagy,
PARK14	PLA2G6	Recessive	EO	22q13.1	> 18 missense variants	Lipids metabolism
PARK15	FBXO7	Recessive	EO	22q12.3	4 point mutations	Mitophagy
PARK16	Unknown	Risk factor	?	1q32	?	?
PARK17	VPS35	Dominant	LO	16q12	2 point mutations	Endosomes
PARK18	EIF4G1	Dominant	LO	3q27.1	1 missense variant	Protein translation
PARK19	DNAJC6	Recessive	EO	1p31.3	9 missense variants	Endosomes
PARK20	SYNJ1	Recessive	EC	21q22.11	3 missense variants	Endosomes
PARK21	DNAJC13	Dominant	LO	3q22.1	1 missense variant	Endosomes
PARK22	CHCHD2	Dominant	LO/EO	7p11.2	1 missense variant, 1 truncation	Mitochondria-mediated apoptosis and metabolism?
PARK23	VPS13C	Recessive	EO	15q22.2	2 missense variants, 1 truncation	Mitophagy
-	GBA	AD, AR in GD Risk factor	LO	1q22	> 10 missense variants	Lysosomes
-	MAPT	Sporadic Risk factor		17q21.31	H1 haplotype increase PD risk and disease severity	Microtubules

EO, early onset; LO, late onset.

Tabella 1.1: Loci e geni associati all'insorgenza e progressione della MP (Del Rey et al, 2018).

Sintomatologia, Diagnosi e Trattamento

Il decorso sintomatologico della MP è principalmente caratterizzato da una progressiva difficoltà nel movimento e culmina con una totale perdita di autonomia. La comparsa dei sintomi più caratterizzanti inizia quando si ha una riduzione del 50-70% dei neuroni dopaminergici, in quanto al di sotto di questa percentuale i meccanismi fisiologici riescono a compensare la perdita di neuroni⁴⁸. Questa malattia è caratterizzata da un'ampia varietà di sintomi che è possibile distinguere in sintomi motori e non motori (*Figura 1.7*).

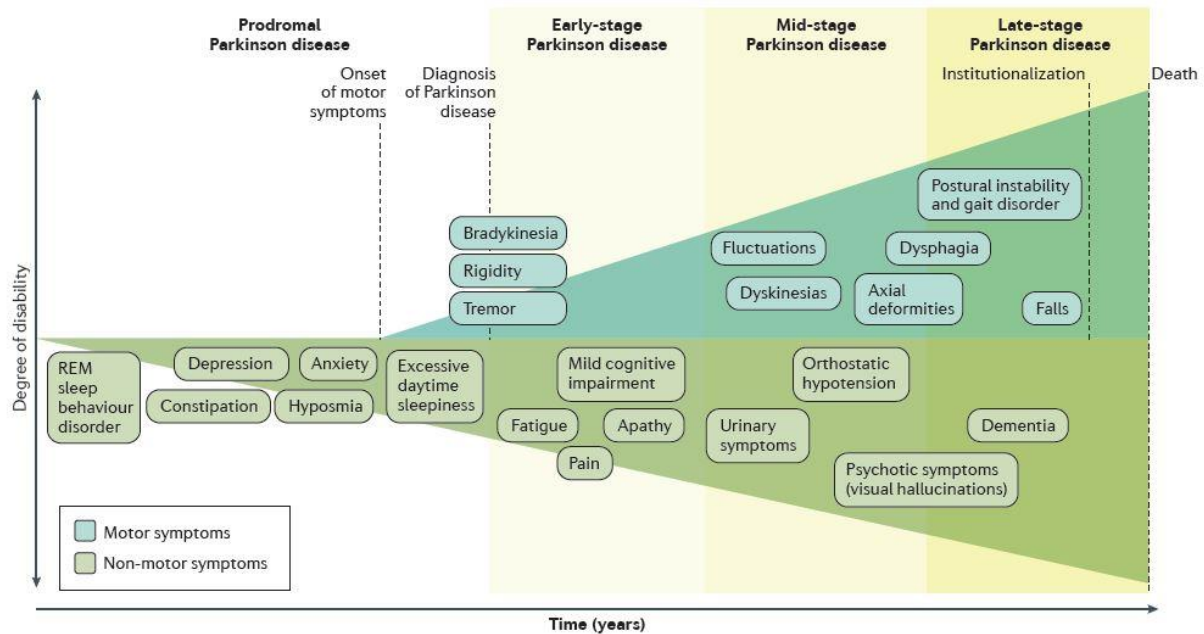


Figura 1.7: Sintomi motori e non motori della MP (Poewe et al, 2017).

Recentemente è aumentato l'interesse per i sintomi non motori in virtù sia della grave situazione invalidante che ne deriva nelle fasi moderate e tardive della malattia, sia per il loro potenziale ruolo di marker prognostico della patologia, in quanto alcuni di questi possono comparire anche molti anni prima dei disturbi motori. Occorre comunque specificare che la maggior parte di questi sintomi è anche dovuta agli effetti collaterali del trattamento farmacologico. Tra i sintomi non motori più frequenti rientrano l'ipotensione ortostatica, che provoca un senso d'instabilità e di mancamento; disturbi gastrointestinali con conseguente aumento della permanenza degli alimenti e dei farmaci nello stomaco; disfagia, scialorrea, iposmia, rinorrea, sudorazione eccessiva, disturbi urologici, disturbi del sonno e disturbi neuropsichiatrici^{48,54}.

Tremore, rigidità, bradicinesia e instabilità posturale⁵⁵, invece, identificano i sintomi motori cardine della malattia.

Il tremore è un movimento ritmico involontario che si manifesta a riposo e scompare temporaneamente durante un movimento volontario. Interessa inizialmente le porzioni distali degli arti superiori, per poi diffondersi ad altre parti del corpo come palpebre, lingua (quando protrusa), mandibola, labbra e piedi nel movimento di flesso-estensione. Talvolta i soggetti avvertono un tremore interno, non percepibile visivamente da altri.

La rigidità indica un aumento del tono muscolare a livello degli arti, del collo e del tronco che riflette una resistenza al movimento. Interessa spesso i grossi gruppi muscolari, che si ritrovano in una condizione di tensione e irrigidimento.

La bradicinesia descrive la lentezza e la faticabilità nell'eseguire semplici movimenti volontari, senza che vi sia una riduzione della forza muscolare. I comuni e semplici gesti diventano più lenti, meno ampi, fino ad esaurirsi e per questo è considerata il sintomo più disabilitante. Negli stadi più avanzati della malattia, alla lentezza dei movimenti, si aggiunge la difficoltà ad iniziare il movimento stesso, definita acinesia.

L'instabilità posturale, invece, si manifesta prevalentemente allo stadio avanzato della malattia, è caratterizzata da una perdita di riflessi di raddrizzamento e tendenza a cadere ed è spesso resistente ai trattamenti farmacologici.

Anche le discinesie, ossia movimenti involontari, sono caratteristiche dei sintomi motori; solitamente si evidenziano qualche anno dopo l'inizio del trattamento terapeutico di sostituzione dopaminergica e per questo si ritiene che derivino anche dalla combinazione della malattia con l'effetto dei farmaci⁵¹.

La diagnosi della MP non può, ad oggi, rimanere un traguardo non raggiunto. I test genetici, ad esempio, non fanno parte del processo diagnostico di questa malattia, tranne che per pazienti in cui vi è un alto rischio genetico, un inizio precoce o un sintomo clinico specifico. Per questa malattia. Inoltre non è stato ancora identificato alcun tipo di marker molecolare utile per la diagnosi e anche se diversi studi hanno individuato livelli alterati di varie proteine, in particolare di diverse forme di α Syn, nel liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti, la bassa sensibilità e specificità di misurazione la rendono inadeguata al trasferimento nella pratica clinica. Per contro, l'evoluzione delle tecniche di neuroimaging (come PET e SPECT) ha fornito risultati incoraggianti potenzialmente applicabili per supportare la formulazione di una diagnosi precoce e differenziale⁴⁸.

Attualmente sono impiegate solo scale di valutazione per la gestione clinica del paziente che viene stratificato sulla base dei deficit motori e non motori. Le scale più utilizzate sono la *scala di Hoehn e Yahr* che suddivide in cinque stadi la progressione dei disturbi motori, tralasciando i sintomi non motori⁵⁶ e l'*Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) che considera invece sia i sintomi motori che quelli non motori (*Tabella 1.2*)⁵⁷.

Poiché la perdita di neuroni dopaminergici è la causa principale dell'insorgenza dei sintomi motori di questa patologia, attualmente, la terapia sostitutiva di dopamina attraverso la somministrazione sistemica del suo precursore (L-DOPA) o la somministrazione di farmaci che mirano più in generale al ripristino dell'attività dei neuroni dopaminergici rappresentano il trattamento farmacologico più efficiente^{58,59}(*Figura 1.8*). Nonostante il buon controllo delle suddette terapie dopaminergiche sui sintomi della MP, sono state sviluppate terapie in grado

di agire altri meccanismi al fine di ridurre da un lato, tutte le complicazioni che derivano dalla terapia che agisce a livello dopaminergico⁶⁰ e dall'altro, tutti quei sintomi (*e.g.* disturbi nella deglutizione, disturbi del linguaggio) sui quali la terapia dopaminergica non ha effetto.

In ogni caso, è importante notare che tutti i suddetti trattamenti identificano terapie sostitutive e pertanto, non sono in grado di curare la patologia, ma soltanto di ridurre i sintomi^{48,55,60}; da qui la necessità di identificare nuove strategie atte a prevenire o ridurre l'insorgenza e la progressione della MP.

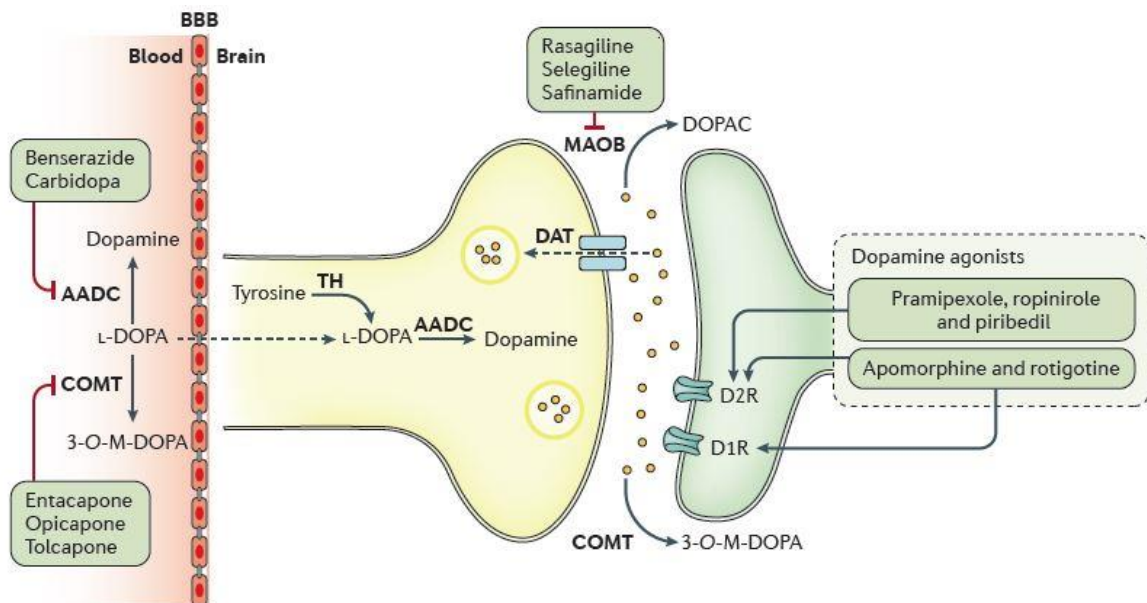


Figura 1.8: Meccanismo di azione delle terapie dopaminergiche (Poewe et al, 2009).

1.2.2 α -Sinucleina nella Malattia di Parkinson

α Syn implicata nella modulazione dell'attività sinaptica. Gli studi di genetica e neuropatologia collegano questa proteina alla MP e ad altre malattie neurodegenerative definite α -sinucleinopatie, tuttavia i meccanismi con cui α Syn agisce nella neurodegenerazione non sono ancora del tutto chiari⁶¹.

α Syn è strettamente correlata alla MP, non solo perché è stata definita la proteina più abbondante nei LB, ma in particolare poiché duplicazioni e triplicazioni del suo gene (SNCA) e tre mutazioni missenso (A53T, A30P ed E46K) nella sua sequenza sono la causa di forme precoci e aggressive di questa malattia⁶²⁻⁶⁶. α Syn è una proteina di 140 amminoacidi, la cui sequenza può essere suddivisa in tre regioni⁶⁷: il dominio N-terminale (residui 1-60), che presenta una struttura ad α -elica anfipatica quando interagisce con lipidi; il dominio centrale idrofobico (residui 61-95), definito componente non amiloide (NAC) capace di adottare una

conformazione a foglietto- β e il dominio C-terminale (residui 96-140) contenente una elevata percentuale di residui acidi carichi negativamente e proline^{68,69} (Figura 1.9).

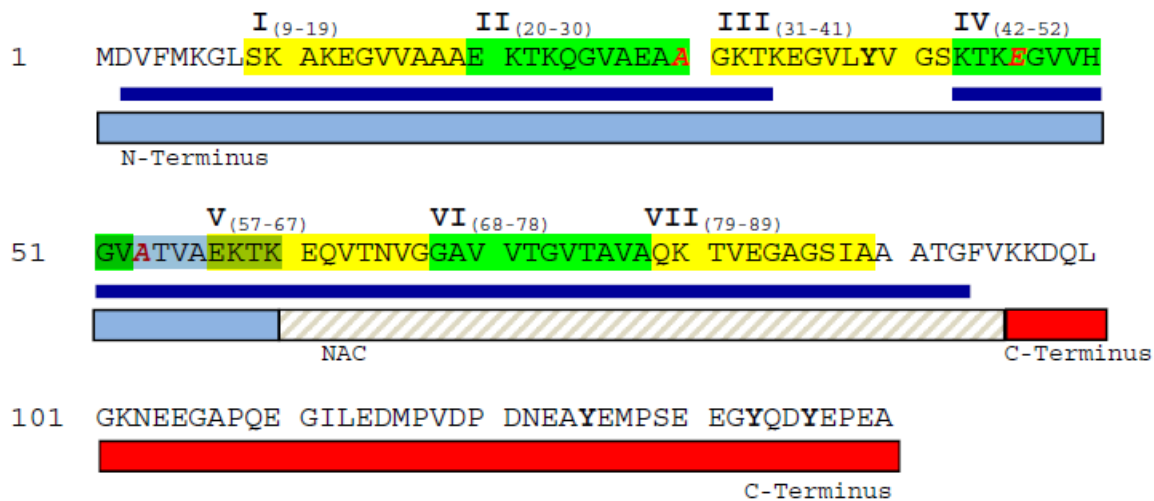


Figura 1.9: Sequenza proteica di α -Syn. In giallo e verde sono evidenziate le 7 ripetizioni del dominio di 11 residui non perfettamente conservati. La regione N-terminale (1-60) è indicata in azzurro; nello specifico i residui (2-32 e 42-92) che presentano una struttura ad α -elica sono sottolineati in blu. Le regioni NAC (61-95) e C-terminale (96-140) sono indicate in grigio e rosso, rispettivamente. Le tre mutazioni (A30P, E46K e A53T) associate a forme precoci ad eredità familiare di MP sono riportate in rosso (Silva et al, 2012).

α Syn è presente sia forma solubile che in uno stato legato alla membrana. La forma non legata alla membrana non possiede una struttura definita^{61,70,71}, al contrario, è caratterizzata da un'elevata plasticità conformazionale, per questo nel citosol si presenta come una miscela eterogenea costituita da forme *unfolded*, monomeriche, dimeriche e tetrameriche non tossiche per la cellula⁷² e in equilibrio fra loro⁷³. Quando α Syn lega le membrane, come le vescicole sinaptiche, subisce, invece, un cambiamento conformazionale che porta alla formazione di α -eliche anfipatiche. La sua propensione a legare i lipidi è data dalla regione N-terminale che ricorda il dominio ad α -eliche anfipatiche delle apolipoproteine; esso infatti contiene 7 ripetizioni di un dominio di 11 residui non perfettamente conservati, varianti della sequenza consenso KTKEGV⁶⁷. È stato visto che la tipologia di elica adottata varia in funzione della curvatura della membrana. In particolare, vescicole con un largo diametro (circa 100nm) e con una bassa curvatura inducono una conformazione ad elica allungata, mentre vescicole con un diametro piccolo e una membrana con un alto grado di curvatura, inducono la formazione di un'elica più corta. Preferibilmente α Syn si lega a vescicole più piccole di circa 40nm⁶¹ (Figura 1.10 A).

α Syn inoltre subisce, principalmente a livello del dominio C-terminale, diverse modificazioni post-traduzionali (e.g. come la fosforilazione, l'ossidazione, l'acetilazione, l'ubiquitinazione, la glicosilazione, la nitrosilazione e la proteolisi) che determinano cambiamenti nella carica e nella struttura della proteina, portando inevitabilmente ad alterazioni della sua funzione. Resta da determinare quindi quali modifiche post-traduzionali sono fisiologicamente rilevanti e quali invece sono associabili a situazioni patologiche⁶¹.

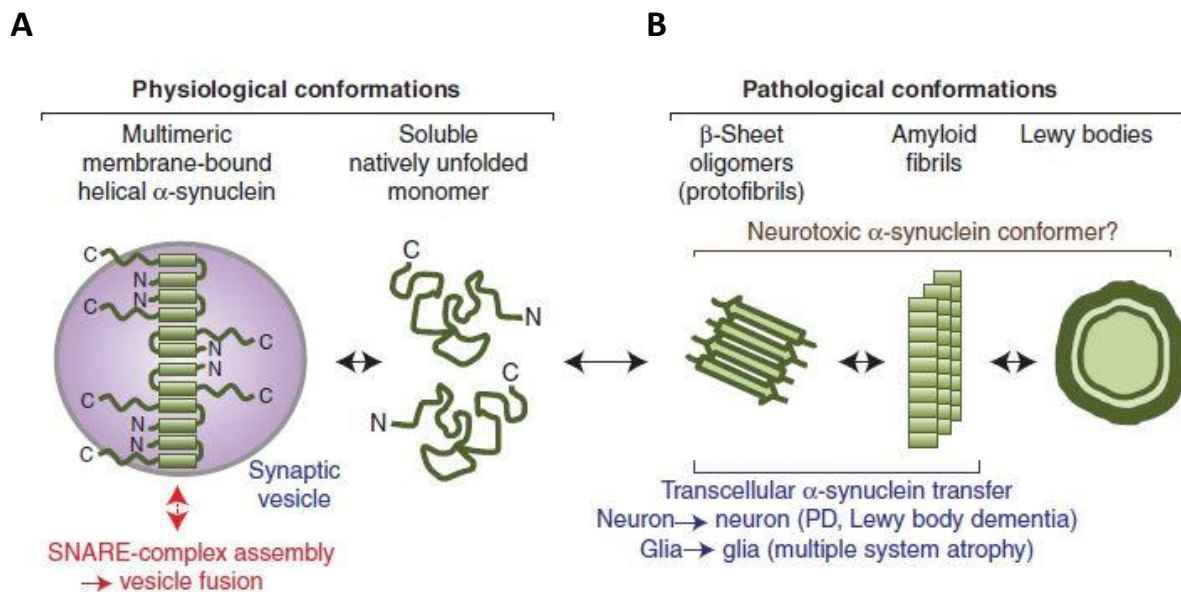


Figura 1.10: Conformazioni strutturali di α Syn in condizioni fisiologiche (A) e patologiche (B) (Burrè et al, 2018).

Aggregazione di α Syn

In determinate condizioni, la forma monomerica *unfolded* adotta, nella regione NAC, una conformazione a β -sheet con conseguente esposizione di residui idrofobici. La presenza di questa struttura rende il monomero pronò ad un processo di aggregazione e infatti diversi studi hanno associato la conformazione a β -sheet con il processo di aggregazione e con la formazione delle fibrille e dei LB⁷⁴⁻⁸⁰ (Figura 1.10 B). L'aggregazione è un processo nucleazione-dipendente che avviene in più stadi, e, fra questi, la fase limitante è identificata dallo stadio in cui si ha la formazione degli oligomeri o nuclei pre-fibrillari solubili^{67,73} (Figura 1.11). Nella fase di nucleazione, il monomero assume una struttura che espone i residui idrofobici e tende così ad aggregarsi con altri monomeri, formando diverse specie

oligomeriche solubili, costituite da circa 10-50 monomeri. Queste strutture sono ricche di interazioni intramolecolari fra β -sheets antiparalleli. Studi recenti hanno identificato diverse popolazioni distinte di forme oligomeriche. Ad esempio, Giehm e colleghi hanno identificato oligomeri con un diametro di circa 18 nm⁸¹ in grado di disgregare le membrane. Altri hanno dimostrato che gli oligomeri formati agli stadi iniziali dell'aggregazione sono principalmente α -elicoidali⁸². È stato evidenziato come le forme oligomeriche di α Syn possano indurre disfunzioni a livello del proteasoma e questo comporterebbe sicuramente un ulteriore accumulo di α Syn *misfolded*. Benché non sia chiaro il meccanismo di azione degli oligomeri è possibile dedurre che la loro formazione non solo riduca la quantità di α Syn endogena con conseguente riduzione della sua funzione fisiologica, ma abbia anche un effetto tossico sulla cellula.

Nella fase successiva, definita fase di elongazione, ulteriori monomeri non correttamente foldati tendono ad aggiungersi agli aggregati già presenti. Questo è un evento molto rapido, durante il quale gli aggregati possono trasformarsi in fibrille mature insolubili. Data la velocità di questa fase è difficile individuare, *in vivo* e *in vitro*, le suddette strutture intermedie, si è infatti in presenza di un equilibrio dinamico e costante tra oligomeri e fibrille. Una volta formate, le fibrille mature e insolubili tendono a precipitare nei LB⁷³. I LB sono descritti come inclusioni morfologicamente eterogenee di diametro variabile fra 5 e 25 μ m e sono strutturalmente composti da un core denso e circoscritto da un alone più chiaro. Una ricostruzione tridimensionale ottenuta con una serie di immagini confocali, ha mostrato una struttura a strati concentrici circondati da neurofilamenti⁸³.

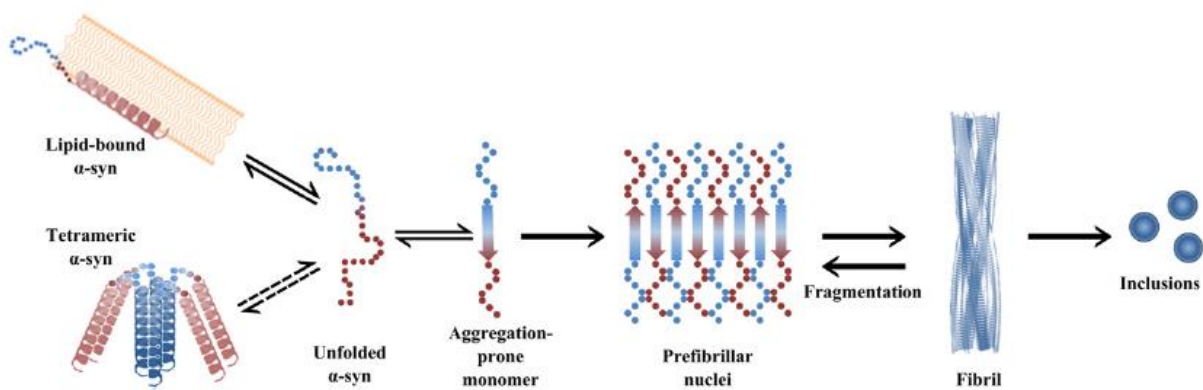


Figura 1.11: Meccanismo ipotizzato per la formazione degli oligomeri (pre-fibrille), fibrille e corpi di Lewy (inclusioni). La forma *unfolded* di α Syn è in equilibrio con il monomero che assume una struttura ad α -elica e interagisce con lipidi, con tetrameri di α -eliche e con la forma caratterizzata da foglietti- β . La fase di nucleazione porta alla formazione di forme solubili oligomeriche (pre-fibrille), che in seguito alla fase di elongazione generano fibrille mature insolubili. Le fibrille sono quindi in equilibrio con i nuclei prefibrillari, perché attraverso meccanismi non ancora ben conosciuti possono essere solubilizzate; le forme fibrillari possono anche essere sequestrate nei corpi di Lewy (Cox et al, 2014).

Il fenomeno di aggregazione è un processo estremamente sensibile a diversi fattori come pH acido, temperature superiori ai 40°C, esposizione ad agenti chimici (erbicidi e pesticidi) e metalli pesanti (rame, piombo, ferro, mercurio, zinco e alluminio), possono influenzarne lo sviluppo⁶⁷. Anche la sovraespressione di α Syn o la presenza delle sue forme mutate, associate alla MP, influenzano le prime fasi di aggregazione. La cinetica di tale processo, tuttavia, si differenzia in base al tipo di mutazione: le mutazioni A53T e E46K formano fibrille più rapidamente rispetto alla proteina wild-type (WT), mentre la mutazione A30P formano più lentamente le fibrille mature, e più rapidamente le forme oligomeriche^{75,84}. Oltre all'intrinseca propensione all'aggregazione di α Syn, diversi fattori sono in grado di influenzare la velocità con cui la proteina aggrega. Ad esempio, la presenza di metalli, pesticidi, lipidi e bassi livelli di pH favorisce la formazione di intermedi pre-fibrillari cruciali per la formazione di nuclei oligomeric^{68,73,85,86}. Al contrario, l'aggregazione è ostacolata dalla presenza di β - e γ -sinucleina^{68,87} e dalla modulazione dell'espressione o attività degli chaperoni molecolari come le HSP⁷³. Cambiamenti nella velocità con cui si verifica l'aggregazione, quindi, possono contribuire al fallimento dei meccanismi di regolazione della proteostasi attivati dalla cellula per far fronte al processo di aggregazione⁷³.

Tossicità delle forme aggregate di α Syn

Come già discusso, le forme aggregate di α Syn portano da un lato ad una perdita di funzione della proteina e dall'altro ad una acquisizione di funzioni alternative, principalmente nocive per la cellula. Al momento, la tossicità di queste forme si ritiene maggiormente imputabile all'acquisto di funzioni tossiche piuttosto che alla perdita di funzione e, in particolare, si ritiene che sia correlata maggiormente agli oligomeri di α Syn e non alle inclusioni fibrillari^{41,44}. È stata dimostrata, infatti, una maggiore tossicità nei neuroni dopaminergici di topi esposti a trattamento con oligomeri solubili rispetto a quelli trattati con forme fibrillari⁸⁸. Tuttavia, le fibrille possono essere una fonte di oligomeri citotossici a causa della loro possibile frammentazione⁸⁹. Ne deriva che la formazione dei LB può quindi rappresentare una strategia neuroprotettiva usata dalla cellula per ridurre la quantità di forme oligomeriche tossiche⁹⁰; è stato infatti dimostrato che la vitalità dei neuroni dopaminergici non varia in base alla presenza o assenza dei LB⁹¹.

I meccanismi proposti per la tossicità di α Syn interessano tutti gli organelli cellulari e per questo sembrano interferire con l'*UPR* nel RE, con la degradazione proteica nel citosol e con la produzione di energia nel mitocondrio⁷³ (*Figura 1.12*). Una dei principali effetti tossici imputabili alle forme oligomeriche di α Syn è dovuta alla loro affinità per i lipidi, che gli conferisce la possibilità di assumere conformazioni sferoidali in grado di legarsi alle membrane e causare la formazione di pori. La formazione di pori può verificarsi su qualsiasi membrana, ad esempio pori sulla membrana plasmatica possono consentire il flusso anomalo di ioni causando una disfunzione cellulare e portando all'apoptosi^{92,93}, l'interazione con la membrana lisosomiale o le membrane del Golgi può inibire nel primo caso l'autofagia mediata da chaperone, portando ad un ulteriore accumulo di substrati, e nel secondo caso innescare la frammentazione del Golgi. Gli oligomeri di α Syn possono inoltre agire sulle vescicole sinaptiche che contengono dopamina, questo ovviamente porterebbe al rilascio e accumulo di dopamina nel citosol, con conseguente stress ossidativo e mancato rilascio del neurotrasmettitore⁷³.

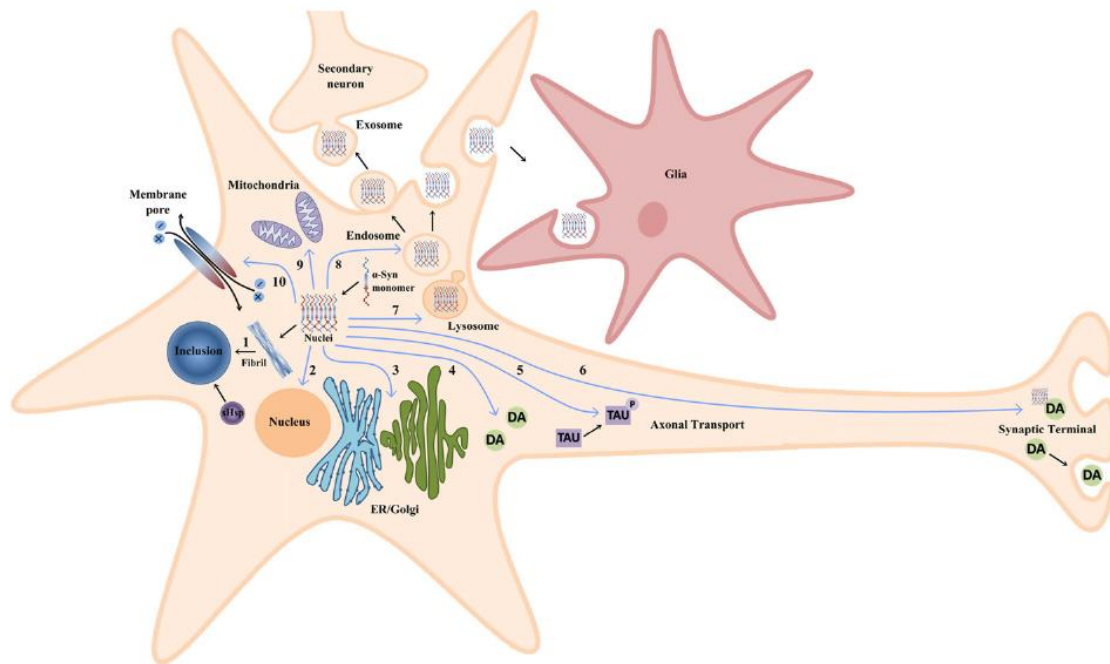


Figura 1.12: Potenziali ruoli tossici delle forme solubili di α Syn in cellule neuronali. (1) Formazione di corpi di Lewy; (2) Induzione della risposta da parte di sHsp; (3) Blocco del traffico ER-Golgi; (4) Stress ossidativo; (5) Malfunzionamento del trasporto assonale; (6) Alterazione dell'eccitabilità della terminazione sinaptica; (7) Alterazione dei meccanismi di autofagia; (8) Rilascio di oligomeri nell'ambiente extra-cellulare; (9) Alterazione nella produzione di energia e aumento della produzione di ROS; (10) Formazione di pori sulla membrana cellulare (Cox et al, 2014).

Prescindendo dalla capacità di legame ai lipidi, gli oligomeri possono anche compromettere il trasporto assonale tramite iperfosforilazione di Tau, una proteina normalmente responsabile della stabilizzazione e regolazione dell'assemblamento dei microtubuli⁹⁴ o possono interferire con la traslocazione di ATF6 nel Golgi favorendo lo stress del RE⁴². Molti studi hanno dimostrato che una piccola frazione di α Syn è localizzata all'interno dei mitocondri e che in situazioni patologiche potrebbe provocare una down-regolazione dell'attività del complesso I. Al tal proposito, forme oligomeriche di α Syn sembrano causare la frammentazione dei mitocondri e indurre la formazione di ROS e stress ossidativo⁹⁵.

Negli ultimi anni è stata dimostrata la presenza di α Syn all'esterno della cellula, pur essendo sempre stata considerata una proteina intracellulare in quanto priva di una sequenza che la indirizzerebbe verso la via secretoria. Il meccanismo di secrezione non è ben chiaro, e potrebbe coinvolgere vescicole, esosomi o endosomi, probabilmente rilasciati in risposta a variazioni della concentrazione del calcio. Studi in colture cellulari hanno dimostrato come aggregati oligomeriche secreti siano particolarmente inclini ad essere inglobati dalle cellule suggerendo quindi una sorta di comunicazione tra cellule e supportando la teoria di propagazione *prion-like* di α Syn. La secrezione può inoltre avere un impatto sull'omeostasi neuronale in quanto è in grado di indurre reazioni infiammatorie da parte delle cellule gliali⁹⁶

(Figura 1.13). Va sottolineato però che gli studi che dimostrano la sua secrezione, utilizzano concentrazioni molto alte di α Syn che non sono assolutamente paragonabili alle condizioni fisiologiche; tuttavia la sua presenza nel fluido cerebrospinale avvalorata l'ipotesi che possa realmente essere coinvolta in un meccanismo di propagazione cellula-cellula.

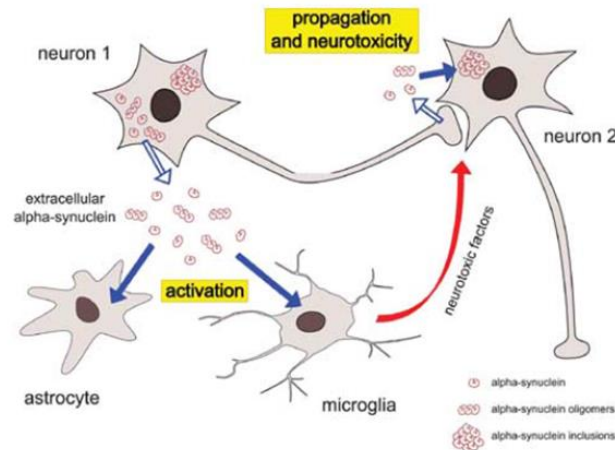


Figura 1.13: Possibile ruolo nel processo di neuro-inflammation e neuro-tossicità della frazione di α -Syn extracellulare. α Syn è secreta dai neuroni nello spazio extracellulare e poi inglobata in astrociti e cellule gliali. Le cellule della microglia rilasciano fattori pro-infiammatori come citochine, acido nitrico e ROS, tossici per i neuroni. α Syn può anche direttamente propagarsi tra i neuroni. (Marques et al, 2012).

Aggregazione di α Syn e chaperoni molecolari

Poiché tra le proteine presenti nei LB^{97,98} sono state identificate anche le HSP, e poiché queste identificano la prima linea di difesa della cellula nei confronti dell'alterazione della proteostasi, l'interesse per il loro ruolo nelle LBD è aumentato drasticamente negli ultimi anni. Studi indipendenti, *in vitro* ed *in vivo*, hanno dimostrato che diverse HSP sono in grado di ridurre il numero di aggregati di α Syn e la loro tossicità e di regolare sia la via di degradazione ubiquitina-proteasoma che quella autofagica⁹⁹ (Tabella 1.2). Alcuni studi, inoltre, sottolineano che la riduzione dell'attività di chaperoni correlata all'età e la presenza di chaperoni all'interno dei LB determini una deplezione degli stessi nella cellula, suggerendo come tali eventi potrebbero direttamente contribuire alla progressione della patologia¹⁰⁰.

HSPs	MW (kDa)	Location in cell	Co-localization	Functions
HSP27	20–30	Cytosol, ER, nucleus	SNCA, Tau	Protein degradation
HSP40	40	Cytosol,	SNCA	Protein folding
HSP60	60	Mitochondria	SNCA	Prevent protein aggregation
HSP70	70	Mitochondria, Cytosol, ER, nucleus	SNCA	Protein folding and unfolding
HSP90	90	Cytosol, ER,	SNCA	Protein degradation and transcription factor
HSP100/104	100–110	Cytosol, ER,	SNCA	Thermal tolerance

Tabella 1.2: Elenco di HSP associate alla MP (Maiti et al, 2017).

1.3 CLUSTERINA: UNO CHAPERONE INTRA- ED EXTRA-CELLULARE

Clusterina (CLU) è una glicoproteina secreta e presente nella maggior parte dei fluidi corporei¹⁰¹. Ad oggi è principalmente presentata come un nuovo chaperone ATP-indipendente extra-cellulare e intra-cellulare^{102,103}. CLU interviene in un'ampia varietà di meccanismi fisiologici, quali interazione cellula-cellula, riproduzione, stress ossidativo, invecchiamento e differenziamento cellulare, ma anche in patofisiologici come la neurodegenerazione e il tumore¹⁰⁴.

Biosintesi, localizzazione e struttura

Il gene di CLU (NG_027845.1) è costituito da 11 esoni e diversi siti di inizio della trascrizione che danno origine a tre varianti trascrizionali, definite in NCBI come variante 1 (NM_001831.4), variante 3 (NR_038335.1) e variante 4 (NR_045494.1). Le tre varianti condividono la sequenza che si estende dall'esone 2 all'esone 9 ma differiscono per la 5'-UTR, ossia per l'esone 1 (non tradotto)^{105,106} (Figura 1.14 A e B).

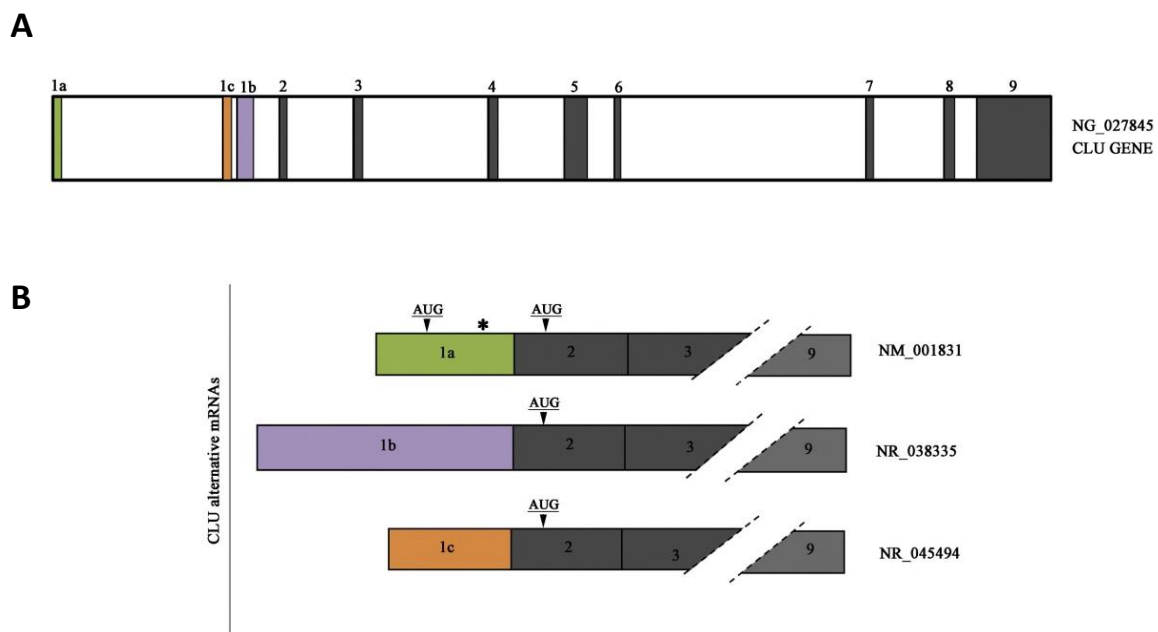


Figura 1.14: Il gene e le tre varianti trascrizionali di CLU.

(A) Rappresentazione del gene di CLU. (B) Varianti trascrizionali di CLU. In verde, viola e arancio rispettivamente le varianti dell'esone 1a, 1b e 1c, mentre in grigio gli esoni comuni. L'asterisco presente nell'esone 1a indica la posizione della TATA box (Bonacini et al, 2015).

L'unica forma isolata e sequenziata di CLU ha origine dalla traduzione a partire dall'AUG sull'esone 2 della variante 1^{107,108} e genera una proteina di 449 amminoacidi (NP_001822.3) (Figura 1.15).

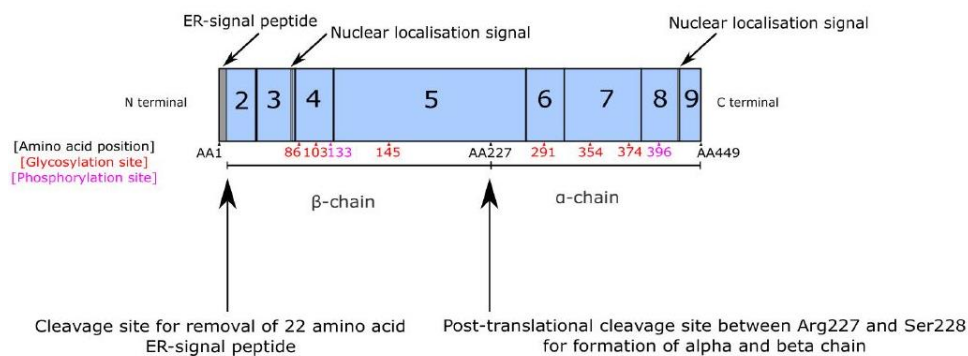


Figura 1.15: Caratteristiche della sequenza proteica di CLU (Foster_2019).

I primi 22 residui del polipeptide identificano la sequenza segnale che assicura la traslocazione co-traduzionale nel RE¹⁰⁹. Nel RE la sequenza segnale viene clivata, mentre la proteina continua ad essere tradotta fino a generare un polipeptide di circa 50 kDa, che dopo aver subito diverse modificazioni post-traduzionali tra cui la formazione di ponti disolfuro tra cisteine e N-glicosilazioni su asparagine, raggiunge un peso di circa di circa 60 kDa, identificando la forma pre-secreta di CLU (pCLU). pCLU viene traslocato nell'apparato del Golgi dove subisce ulteriori modifiche alle catene oligosaccaridiche e un taglio proteolitico tra l'Arg₂₂₇ e la Ser₂₂₈ che produce una catena N-terminale (catena α) e C-terminale (catena β), entrambe di circa 40 kDa e legate fra loro dai ponti disolfuro; il dimero così formato costituisce la forma di CLU pronta alla secrezione (sCLU)¹¹⁰ (Figura 1.16). Diversi studi hanno mostrato come la glicosilazione che avviene nel RE sia un requisito fondamentale per il corretto folding e l'attività di chaperone, mentre le modifiche oligosaccaridiche nel Golgi siano necessarie per il legame con recettori di membrana e per la trasduzione del segnale. L'assenza dei ponti di solfuro, invece, sembra essere importante per il corretto folding e maturazione di sCLU, ma non risulta essenziale per la sua attività di chaperone.

Inizialmente CLU era stata identificata come una proteina destinata esclusivamente alla secrezione, ma la rilevazione di forme di CLU all'interno della cellula (iCLU) ha fatto supporre come che questa proteina potesse avere anche una localizzazione, e di conseguenza funzione, intracellulare^{111,112}. A differenza del processo di biosintesi di sCLU, l'origine delle forme intracellulari non è ben chiara; inizialmente si pensava che si originassero da splicing

alternativi, ma al momento l'idea è che anche le forme intracellulari derivino dalla variante trascrizionale 1 e che la localizzazione intracellulare sia dovuta a modifiche post traduzionali o del pathway di secrezione^{106,108}. Numerosi studi hanno mostrato come l'induzione di stress cellulare determina un accumulo di CLU all'interno della cellula^{112,113}, altri hanno dimostrato il re-uptake di sCLU dall'ambiente extracellulare^{114,115} e altri hanno mostrato l'inibizione¹¹⁶ o l'alterazione di un pathway di secrezione alterato, che porta ad avere CLU all'interno della cellula in una forma non completamente glicosilate¹⁰⁸.

Se da un lato è ben definito il processo di biosintesi, dall'altro mancano informazioni sulle sue proprietà strutturali. Una delle ragioni risiede nella capacità di sCLU di legare diverse proteine mediante interazioni idrofobiche. sCLU, infatti, sembra appartenere ad una classe di proteine prive di una definita struttura terziaria e quindi che espongono esternamente residui idrofobici fino a formare un dominio *molten globule-like*¹¹⁷ che interagisce con diverse proteine.

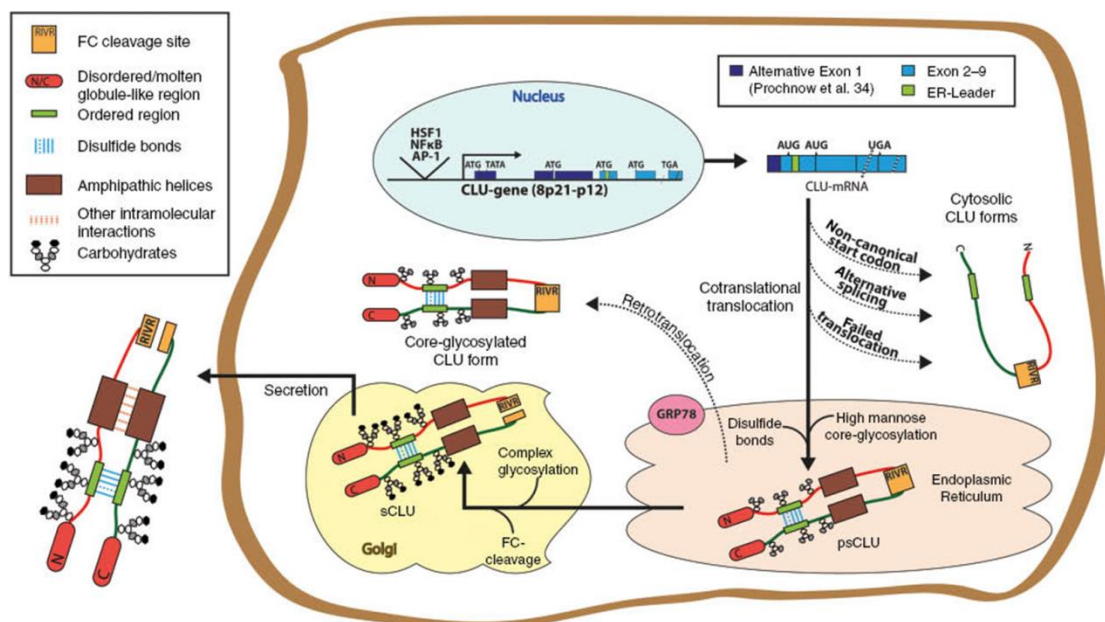


Figura 1.6: Rappresentazione della via di biosintesi di CLU (Rohne_2016).

Funzione

Il ruolo di CLU non è stato ancora definito in modo univoco, ma per via della sua capacità di interagire con un'ampia gamma di molecole, si pensa che svolga diverse funzioni in differenti processi biologici. Ad oggi, tuttavia, la funzione meglio caratterizzata è quella di chaperone intra ed extracellulare in maniera ATP-indipendente, pur avendone un motivo in grado di legare nucleotidi; infatti, l'induzione di CLU osservata in seguito a shock termico ha fatto supporre che potesse rientrare nella categoria delle sHSP^{118,119}. Poon e colleghi dimostrarono che CLU, a concentrazioni fisiologiche, svolge la sua attività di chaperone interferendo con la precipitazione di proteine (glutazione S-trasferasi, catalasi, ovotrasferrina, IgG, α -lactalbumina e albumina) causata da stress come il calore o dalla presenza di agenti riducenti come il ditiotreitolo (DTT)¹²⁰. , CLU eserciterebbe la sua funzione di chaperone in maniera al fine di stabilizzare le proteine mal ripiegate e impedire la loro interazione. In soluzione acquosa a pH fisiologico, CLU si trova o come eterodimero α/β o come aggregati di eterodimeri ed è attiva nel processo di folding solo quando si trova in forma di eterodimerica¹²¹. pH acidi, invece, favoriscono la dissociazione degli aggregati aumentando l'esposizione delle regioni idrofobiche della proteina e favorendo, di conseguenza, l'attività di chaperone¹²⁰. CLU mantiene la sua funzione di chaperone sia quando glicosilata sia quando non glicosilata. È da notare comunque che la deglicosilazione aumenta l'esposizione delle regioni idrofobiche favorendo il legame con i potenziali ligandi, probabilmente per l'assenza dell'ingombro sterico dei residui di zuccheri coniugati¹²². Yerbury e collaboratori hanno proposto un modello d'azione di CLU nel processo di folding di proteine extracellulari, secondo il quale CLU, all'esterno della cellula, riconosce e lega le regioni idrofobiche delle proteine target e le indirizza all'interno della cellula, dove sono degradate dai lisosomi⁵. CLU infatti è in grado di legare recettori specifici per l'endocitosi come la glicoproteina 330 (gp330) /megalina, un recettore presente sulla superficie cellulare e appartenente alla famiglia dei recettori delle lipoproteine a bassa densità. Per contro, si pensa che il meccanismo di azione di CLU all'interno della cellula sia simile a quello delle sHSP, si ritiene infatti che CLU¹²¹. La forma eterodimerica di CLU attraverso le sue regioni idrofobiche, quindi, legherebbe le porzioni idrofobiche esposte delle proteine bersaglio funzionando come una sorta di serbatoio refolding-competente, in grado di fornire ai chaperoni ATP-dipendenti, come Hsp70, in grado di promuoverne il corretto e diretto folding. È stato, infatti, dimostrato che CLU, non essendo dipendente dall'ATP, di per sé incapace di determinare il ripristino del folding^{123,120} (Figura 1.17).

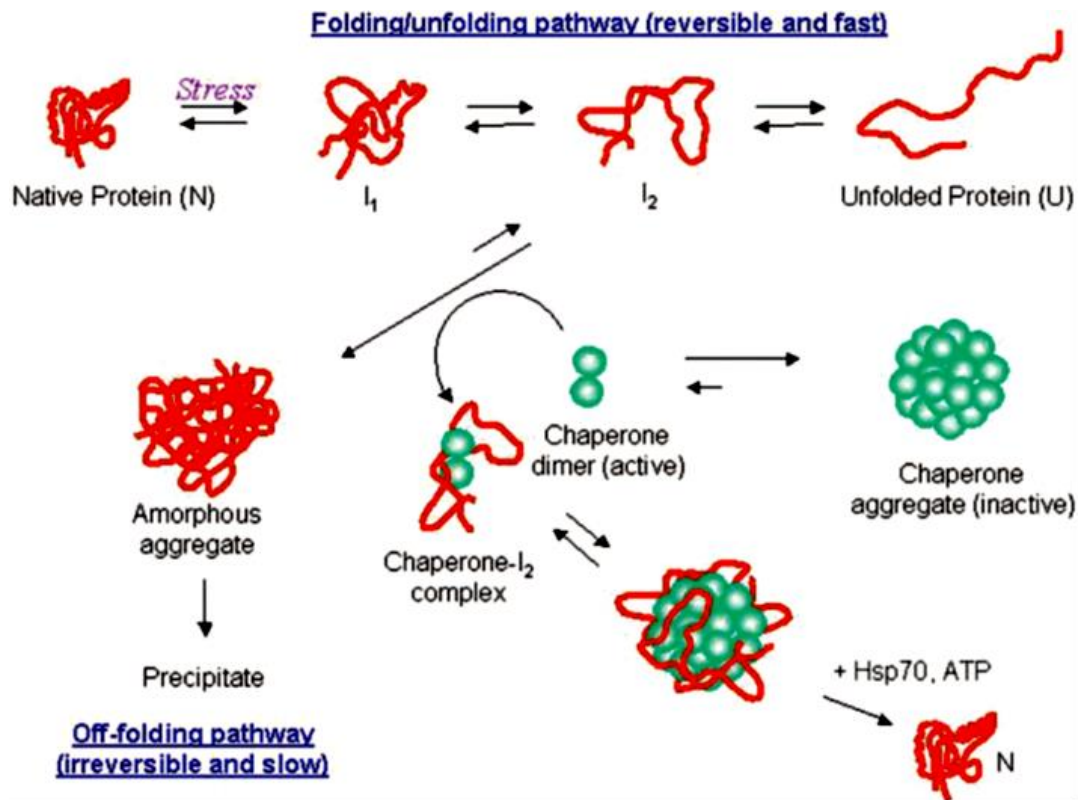


Figura 1.17: Rappresentazione schematica del modello d'azione di CLU all'interno della cellula. (Carver et al, 2003).

1.3.1 Clusterina e malattie neurodegenerative

Nel cervello CLU è principalmente espressa e secreta dagli astrociti, tuttavia è espressa anche da altri tipi di cellule, inclusi i neuroni. Una imponente mole di letteratura è stata pubblicata a sostegno del suo coinvolgimento in numerose patologie neurodegenerative^{106,110}, dimostrando come la sua attività di chaperone sia in grado di ridurre la formazione di aggregati proteici e la tossicità che ne deriva.

Malattia di Alzheimer

La prima relazione tra CLU e MA è stata riscontrata più di vent'anni fa quando uno studio *in vitro* hanno mostrato che CLU preveniva la formazione di aggregati dell'amiloide β ($A\beta$) o che, grazie al suo legame con i recettori della megalina mediava il trasporto dell' $A\beta$ attraverso la barriera ematoencefalica ed ematoliquorale¹⁰⁶.

Numerosi studi presenti in letteratura evidenziano un duplice ruolo di CLU nella genesi di questa patologia, è stato, infatti, dimostrato che può prevenire la formazione di aggregati dell' $A\beta$ o favorirla¹²⁴⁻¹²⁶, in funzione del rapporto stechiometrico fra CLU e la proteina

bersaglio. L'oligomerizzazione è favorita solo in presenza di un grande eccesso molare di peptidi β o di oligomeri rispetto a CLU, mentre è prevenuta in condizioni di basse concentrazioni di peptidi β ^{103,106}.

Dal punto di vista genetico, la relazione tra CLU e MA sembra essere legata alla presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) di CLU (rs11136000-T e rs11136000-C)¹²⁷, inoltre, recenti studi di associazione genome-wide (Genome Wide Association Study - GWAS) e di meta-analisi hanno suggerito che la frequenza di alcune mutazioni puntiformi, presenti nella catena β di CLU, è maggiore in individui affetti da MA¹²⁸.

Encefalopatie spongiformi

Studi condotti nell'uomo e in modelli animali di encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) hanno indicato l'esistenza di una relazione tra CLU e formazione di depositi di proteine prioniche (PrP^{sc}) nel sistema nervoso e linforeticolare tipici delle EST^{129,130}.

Analisi di doppio ibrido e di dicroismo circolare di sequenze prioniche umane clonate hanno confermato che le regioni N e C-terminali delle PrP umane interagiscono con CLU, in particolare con la subunità α ¹³¹. L'ipotesi è che CLU partecipa alla patodinamica delle EST intervenendo ad esempio nella propagazione delle PrP e nel sequestro delle sue isoforme tossiche^{129,132}. Inoltre l'analisi delle urine di bovini affetti da EST ha mostrato che gli animali affetti presentano un'elevata glicosilazione della catena β di CLU¹³³.

Malattia di Parkinson

Un'altra patologia in cui si ipotizza il coinvolgimento di CLU è MP. Questa ipotesi si basa su uno studio che ha evidenziato la co-localizzazione di CLU e α Syn nei LB in biopsie di cervello di pazienti affetti da α -sinucleinopatie¹³⁴. In particolare la co-localizzazione è stata evidenziata in biopsie di pazienti affetti da MP, da demenza con corpi di Lewy e nell'atrofia multisistemica caratterizzata da inclusioni gliali. L'interazione tra CLU e α Syn stata è stata inoltre dimostrata in cellule MES esposte a rotenone, mediante spettrometria di massa¹³⁵. In diversi studi, inoltre, si riscontra un aumento dell'espressione di CLU nel plasma e nel fluido cerebrospinale in pazienti affetti da MP^{136,137}. A tal proposito, alcuni autori suggeriscono un possibile ruolo di CLU come marker per la diagnosi della MP¹³⁸. Infine, un recente studio GWAS indica che il polimorfismo SNP rs11136000-T, non è associato solo alla MA, ma può essere considerato un fattore di rischio anche per la MP¹³⁹.

Tutti gli studi citati, seppur solo esplorativi, suggeriscono come CLU possa essere coinvolta nella MP, al pari di quanto accade nelle altre patologie neurodegenerative, e quindi, allo stesso tempo identificano un presupposto per indagare il suo ruolo anche in questa patologia.

2. SCOPO

Un comune aspetto a molte malattie neurodegenerative è il deficit dei sistemi di controllo della qualità delle proteine con conseguente accumulo intracellulare di proteine difettose e/o mal ripiegate che, quindi, partecipano alla formazione di aggregati ed inclusioni citoplasmatici, spesso identificati come marker patologici di queste malattie. Nella MP tali inclusioni sono costituite prevalentemente dalla proteina α Syn ed è ormai ben noto che la formazione di oligomeri e fibrille di questa proteina svolge un ruolo cruciale nella patogenesi della MP, innescando un processo a cascata che porta alla formazione dei LB. Nonostante i progressi scientifici abbiano fatto luce su molti aspetti dell'eziopatogenesi della MP, rimane la necessità di individuare target molecolari per diagnosticare precocemente l'esordio della malattia, seguirne il decorso clinico e definire nuove terapie in grado, non solo di ridurre i sintomi della patologia, ma di rallentarne la progressione.

Gli chaperoni e le HSP costituiscono parte del meccanismo di controllo della proteostasi cellulare ed esercitano la loro attività stabilizzando parzialmente le proteine, dissociando gli aggregati proteici o dirigendo le proteine *misfolded* verso i sistemi di degradazione cellulare. Numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che le HSP possono efficacemente prevenire/rallentare l'aggregazione di α Syn.

Nella MA è stato dimostrato che CLU, una glicoproteina secreta capace di funzionare come una HSP ATP-indipendente, interagisce con le specie monomeriche e oligomeriche del β -amiloide, inibendo l'accrescimento delle fibrille; controlla l'internalizzazione e la clearance del β -amiloide tramite i recettori LRP2; co-localizza con depositi della proteina Tau, con neurofibrille e placche senili ed è *up-regolata* nel plasma e nel fluido cerebrospinale di pazienti affetti da MA^{113,140-142}.

Alcune recenti pubblicazioni suggeriscono un possibile coinvolgimento di CLU anche nella MP, dal momento che il suo livello di espressione aumenta nel plasma e nel fluido cerebrospinale di pazienti affetti da questa patologia e che è presente nei LB di pazienti affetti da α -sinucleinopatie. Tuttavia, a parte i pochi studi esplorativi citati, mancano evidenze sperimentali che possano validare un ruolo funzionale di CLU nell'eziopatogenesi della MP, con particolare riferimento alla sovrpressione ed all'aggregazione di α Syn.

Lo scopo di questo progetto è indagare se CLU, sulla base della propria capacità di legare proteine malfoldate, è coinvolta, al pari di chaperoni maggiormente investigati, nelle fasi precoci del processo neurodegenerativo e, in particolar modo, se ha un ruolo nella formazione degli aggregati di α Syn e nei meccanismi di difesa cellulare attivati per contrastare la tossicità derivata dalla formazione di oligomeri.

Lo studio è stato effettuato articolando l'attività sperimentale in modelli di complessità crescente, impiegando colture cellulari, modelli animali e includendo anche valutazioni retrospettive istologiche e molecolari su campioni di tessuto cerebrale umano.

Nella prima parte del lavoro, saranno mostrate le analisi eseguite presso l'Università di Oxford su campioni di tessuto cerebrale umano appartenenti a soggetti, selezionati dalla Clinic-pathological OPTIMA cohort (Oxford Project to Investigate Memory and Ageing) dell'Oxford Brain Bank (OBB), affetti da LBD.

In seguito, saranno presentati i risultati della sperimentazione *in vitro*, ottenuti in cellule di neuroblastoma umano (SH-SY5Y) sovraesprimenti stabilmente la proteina α Syn. Questi risultati mirano a stabilire i rapporti di localizzazione e interazione fra CLU e α Syn e la funzione di CLU nei meccanismi di difesa cellulare attivati in condizioni che mimano l'alterazione della proteostasi producendo l'aggregazione di α Syn.

Nell'ultima parte di questo lavoro saranno descritti i dati relativi alla sperimentazione *in vivo*, svolta in collaborazione con il Prof. Michele Zoli, dell'Università di Modena e Reggio Emilia, che mira a studiare gli effetti della delezione genica di CLU sulla neurodegenerazione indotta da iniezione unilaterale stereotassica intracranica di rotenone. Lo studio è stato eseguito in topi del ceppo C57Bl/6^{CLU+/+} e C57Bl/6^{CLU-/-}, ovvero knockout per CLU.

La verifica dell'ipotesi che CLU, un putativo chaperone intra- ed extra-cellulare, svolga un ruolo neuroprotettivo interferendo con il processo di aggregazione di α Syn potrebbe fornire nuove conoscenze per sviluppare strategie farmacologiche potenzialmente in grado di modificare il decorso della malattia.

3. MATERIALI E METODI

STUDIO EX VIVO

3.1 CAMPIONI CEREBRALI UMANI

Per questo studio sono stati acquisiti dalla Clinic-Pathological OPTIMA Cohort (Oxford Project to Investigate Memory and Ageing) dell'Oxford Brain Bank (OBB) 24 campioni di tessuto cerebrale umano prelevati *post-mortem* dallo striato di soggetti di entrambi i sessi e di età compresa tra 56 e 100 anni. I campioni appartengono a soggetti sani (n=8) e a pazienti affetti da LBD a diversi stadi della patologia secondo la scala di Braak (n=16). La stadiazione di Braak si riferisce a un metodo per classificare il grado della patologia mediante l'analisi istologica del tessuto cerebrale prelevato ed analizzato *post-mortem*.

3.2 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE E ANALISI SIMPLE WESTERN (Peggy™)

Per ogni campioni, a 30 mg di tessuto cerebrale sono stati addizionati in 300 µL di Buffer di Lisi (5 mM HEPES pH 7,4, 320 mM Saccarosio, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) addizionato di cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi (Roche, Basel, CH). Ogni campione è stato sonicato a 20.000 rpm per 15 secondi in ghiaccio. Il lisato così ottenuto è stato centrifugato a 10.000 rpm per 15 minuti a 4°C, al fine di recuperare il surnatante contenente le proteine solubili. La concentrazione delle proteine è stata determinata utilizzando il BCA Protein Quantification Kit (Abcam, UK) in accordo con il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Il livello di espressione delle proteine di interesse è stato misurato mediante il sistema Simple Western™, utilizzando lo strumento Peggy Sue™ (ProteinSimple, Bio-technie). Il sistema Simple Westerns™ è una ottimizzazione della comune analisi Western Blot (WB) in quanto utilizza un'elettroforesi capillare e automatizzata per identificare e quantificare le proteine di interesse in una miscela eterogenea di proteine. Brevemente, i campioni sono miscelati con Simple Western Sample Buffer fino a una concentrazione finale di 2 µg/µL e poi denaturati a 95°C per 10 min. I campioni preparati e tutte le componenti necessarie per la corsa elettroforetica e l'analisi WB sono dispensati in pozzetti designati in una piastra da 384 pozzetti, in accordo con il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Successivamente, il buffer di lavaggio, il tampone per la corsa, i capillari e la piastra precedentemente preparata sono inseriti negli appositi spazi dello strumento Peggy Sue™, che esegue automaticamente tutte le fasi dell'analisi. Le proteine sono separate nei capillari migrando attraverso lo *stacking* e

running gel e successivamente, immobilizzate alla parete capillare tramite UV. La proteina di interesse è riconosciuta da un anticorpo primario e successivamente è rilevata grazie ad un anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP) e substrato chemiluminescente. I risultati, in termini di corsa elettroforetica nel capillare, peso molecolare e area sono riportati automaticamente nel software Compass per ogni campione analizzato. Per ogni campione, il valore dell'area ottenuto è stato normalizzato per il valore dell'area della β -actina, gene housekeeper impiegato come controllo quantitativo del caricamento di ogni campione.

STUDIO IN VITRO

3.3 MANTENIMENTO DELLA LINEA CELLULARE SH-SY5Y

Sono state utilizzate cellule di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, acquistate dall'American Tissue Culture Collection (ATCC). Le cellule sono state coltivate in terreno di coltura DMEM:Ham's F12 (1:1) addizionato di siero fetale bovino (FBS) al 10% (Lonza, Basel, CH), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE), 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL streptomicina (Euroclone, Milano, IT); il mezzo così preparato è definito completo. Le cellule sono state coltivate ad una temperatura di 37°C e in atmosfera controllata al 5% di CO₂. Le SH-SY5Y sono cellule che crescono principalmente in adesione e sono state staccate dal supporto di crescita mediante tripsina/EDTA 0,5 g/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE). In breve, si effettua un lavaggio veloce con tripsina a cui segue l'incubazione a 37°C per qualche secondo con la stessa. Avvenuto il distacco delle cellule dal supporto, si procede aggiungendo un volume doppio di mezzo DMEM completo rispetto al volume di tripsina utilizzato, per inattivare la tripsina stessa. Le cellule si trasferiscono in tubi da 15 mL e si procede con la conta utilizzando una camera Burker. La sospensione è quindi centrifugata per 5 minuti a 1.200 rpm; il surnatante è eliminato ed il pellet di cellule è risospeso nel volume di mezzo DMEM completo adeguato per la densità di semina desiderata.

3.4 CLONI STABILI SOVRAESPRIMENTI α -SYN E CLONI CONTROLLO

Le cellule SH-SY5Y sono state seminate alla densità di 400×10^3 cell/mL in dish da 60 mm al fine di raggiungere, 24 ore dopo la semina, una confluenza pari all'80-90% e trasfettate con i plasmidi pHM6-Syn-WT e pHM6-Mock, utilizzando il K2[®] *Transfection System*. Le cellule sono state incubate in DMEM completo contenente il reagente K2[®] Multipler a 37°C per due ore. Contemporaneamente, è stata preparata la miscela di trasfezione incubando la soluzione A e la soluzione B (preparate come riportato in Tabella 3.1) a temperatura ambiente per 15 minuti. Dopo le 2 ore di incubazione delle cellule con il reagente K2[®] Multipler, la miscela è stata aggiunta alle cellule e lasciata a contatto con esse per 7 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione è stato eseguito il cambio mezzo. In parallelo, per valutare l'efficienza di trasfezione le cellule sono state seminate alla densità di 380×10^3 cell/mL in dish da 35 mm e poi trasfettate con il plasmide di espressione pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA) nelle condizioni sperimentali riportate in Tabella 3.1.

Per ottenere le cellule sovraespressanti α Syn (SH-Syn) ed i controlli (SH-Mock), 48 ore dopo la trasfezione è stata eseguita la selezione delle cellule che hanno integrato stabilmente il plasmide aggiungendo 800 μ g/mL di G418 (geneticina) in DMEM completo. Dopo circa 2 settimane di selezione è stata ottenuta, per entrambe le linee, una popolazione policlonale, mantenuta per le successive analisi in mezzo completo addizionato di 200 μ g/mL di geneticina (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE).

Dish	K2 [®] Multipler	Soluzione A	Soluzione B
35 mm	- 12,5 μ L K2 [®] Multipler - 2 mL DMEM completo	- 3,7 μ g di DNA - DMEM (Serum Free), volume finale di 50 μ L	-36 μ L DMEM (Serum Free) -14 μ L K2 [®] Multipler
60 mm	- 33 μ L K2 [®] Multipler - 5 mL DMEM completo	- 9,8 μ g di DNA - DMEM (Serum Free), volume finale di 130 μ L	-94 μ L DMEM (Serum Free) -36 μ L K2 [®] Multipler

Tabella 3.1: Condizioni sperimentali utilizzate per il protocollo di trasfezione con il K2[®] Reagent System.

3.5 TRATTAMENTO CON MG132

Le cellule SH-Syn e SH-Mock sono state seminate in dish da 60 mm alla densità di 300×10^3 cell/mL 24 ore prima del trattamento. Il giorno successivo, le cellule sono state incubate con 5mL di terreno di coltura completo contenente 0,4 μ M MG132 (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE), un potente inibitore del proteasoma, per 48 ore. La concentrazione di MG132 impiegata corrisponde al valore che inibisce la vitalità cellulare del 50% (IC50) rispetto alle cellule di controllo che non ricevono il farmaco. Il tempo di trattamento è stato ridotto a 24 ore quando combinato alla manovra di silenziamento di CLU (paragrafo 3.6).

3.6 TRASFEZIONE CON siRNA

Il silenziamento di CLU è stato condotto trasfettando le cellule con un siRNA (5'-GCAGCAGAGUCUUCAUCAU-3', Ambion, Austin, TX) di sequenza complementare a una porzione dell'esone 2 di CLU (siRNA-CLU) e in grado di silenziare contemporaneamente tutte le sue varianti trascrizionali. La condizione di controllo è rappresentata da cellule cresciute nelle medesime condizioni, trasfettate con una sequenza siRNA di controllo (siRNA-NC) che non appaia ad alcun mRNA presente all'interno della cellula (Integrated DNA Technologies, Coraville, CA). Le cellule SH-Syn e SH-Mock sono state seminate alla densità di 150×10^3 cell/mL in dish da 35 mm e trasfettate con 100 nM di siRNA-CLU o siRNA-NC impiegando il reattivo *Trans-IT-TKO Transfection Reagent* (Mirus Bio, Madison, WI). In breve, il reattivo di trasfezione viene miscelato al DMEM privo di siero (20 μ L di

reattivo ogni 200 μL di DMEM privo di siero) e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. In seguito si aggiungono alla miscela di reazione 100 nM di siRNA-CLU o siRNA-NC e si mantiene in incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, 200 μL della miscela sono aggiunti alle cellule mantenute in 1,8 mL di mezzo completo ma privo di antibiotici. La miscela è tenuta a contatto con le cellule per 24 ore.

3.7 SAGGI DI VITALITÀ E PROLIFERAZIONE CELLULARE

3.7.1 Colorazione con Trypan blue

Il Trypan blue è un colorante vitale che colora selettivamente le cellule morte, sia apoptotiche che necrotiche, poiché presentano una membrana permeabile. Brevemente, a 25 μL di sospensione cellulare sono aggiunti 25 μL di Trypan Blue. 10 μL della miscela così ottenuta sono trasferiti nella camera di Burker per permettere la conta delle cellule vitali (cellule non colorate) e non vitali (cellule colorate). Per ogni analisi, i campioni sono stati analizzati in triplicato. Il calcolo della percentuale di cellule vive è ottenuto come esplicitato dalla seguente formula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ cellule vitali}}{\text{N}^\circ \text{ cellule vitali} + \text{N}^\circ \text{ cellule non vitali}} \times 100$$

3.7.2 Saggio WST-1

Il saggio di vitalità cellulare WST-1 (Roche, Lewes, UK) sfrutta l'attività di deidrogenasi mitocondriali di cellule metabolicamente attive, le quali trasformano il sale di tetrazolio in formazano. Il formazano prodotto è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali e può essere quantificato misurando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 450 nm. Il protocollo prevede la rimozione del terreno di coltura e la sua sostituzione con terreno fresco addizionato del reagente WST-1 al 10% (v/v). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C, la produzione di formazano è quantificata tramite la determinazione dell'assorbanza con il lettore di piastre EnSpire® Multimode Plate Readers (PerkinElmer, Waltham, MA).

In questo lavoro di tesi, il saggio è stato utilizzato per calcolare una curva dose-risposta del trattamento con MG132 e per studiare l'effetto del silenziamento di CLU sulla vitalità cellulare.

A tal proposito, per calcolare la curva dose-risposta, le cellule SH-Syn e SH-Mock sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 150×10^3 cell/mL per pozzetto. Il giorno successivo, le cellule sono state trattate con 200 μ L di mezzo di coltura completo con concentrazioni crescenti di MG132 (0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 - 2 μ M) per 48 ore. Si è, quindi, proceduto con il protocollo del saggio di vitalità al fine di ottenere una curva dose-risposta, da cui si sono ricavati i valori di concentrazione inibente la vitalità cellulare per il 50% (IC50), tramite analisi di regressione non-lineare (funzione logistica a quattro parametri) utilizzando il programma SigmaPlot (versione 12.0). I valori di IC50 così calcolati sono stati utilizzati per i trattamenti descritti in questo lavoro sperimentale.

Per valutare l'effetto del silenziamento di CLU sulla vitalità cellulare, le cellule SH-Syn e SH-Mock in presenza o assenza di trattamento, sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 150×10^3 cell/mL. Il giorno successivo, le cellule sono state silenziate mediante siRNA (come descritto nel paragrafo 3.6) e al termine della procedura si è proceduto con il saggio di vitalità. Per ogni analisi, i campioni sono stati analizzati in triplicato.

3.7.3 Saggio cristal violetto

La proliferazione cellulare dei cloni SH-Syn e SH-Mock è stata valutata con il saggio colorimetrico che utilizza il cristal violetto, un colorante basico ad alta affinità per le strutture cellulari con carica negativa, come il DNA. I cloni SH-Syn e SH-Mock sono stati seminati alla densità di 70×10^3 cell/mL in piastre 6-well e il saggio è stato eseguito dopo 48, 72, 96, 120, 144 ore dalla semina. Al termine del tempo prestabilito, le cellule sono state lavate con PBS 1X prima di essere fissate con paraformaldeide al 4% in PBS 1X per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono poste a contatto con una soluzione contenente cristal violetto 0.5% (p/v) (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) in metanolo al 20% (v/v) per 15 minuti. Dopo accurati lavaggi con H₂O il colorante, penetrato nelle cellule, è estratto con una soluzione di sodio citrato 0.1 M in etanolo al 50%, pH 4,2 e quantificato misurando l'assorbanza a 540 nm con l'ausilio dello strumento EnSpire® Multimode Plate Readers (PerkinElmer, Waltham, MA). Il valore di assorbanza misurato è proporzionale al numero di cellule presenti. Per ogni analisi, i campioni sono stati analizzati in triplicato.

3.8 SAGGIO DI ATTIVITÀ DELLE CASPASI 3/7

Per valutare l'eventuale attivazione di un processo apoptotico è stato utilizzato il kit *Caspase-Glo*® 3/7 Assay (Promega, Madison, WI). In particolare questo saggio misura l'attività delle

caspasi 3/7 (caspasi effettatrici) che hanno l'esclusivo ruolo di mediare l'apoptosi. Il kit fornisce uno specifico substrato pro-luminiscente (contenente la sequenza tetrapeptidica DEVD) riconosciuto dalle caspasi 3/7, in un reagente ottimizzato sia per la lisi cellulare che per la rilevazione del segnale luminescente. L'aggiunta del reagente fornito dal kit determina, quindi, la lisi cellulare e la scissione del substrato da parte delle caspasi, se attive. La scissione del substrato rilascia amminoluciferina sulla quale agirà la luciferasi. Il segnale luminescente prodotto sarà, quindi, direttamente proporzionale all'attività delle caspasi 3/7.

I cloni SH-Syn e SH-Mock sono stati seminati in una piastra nera da 96 pozzetti alla concentrazione di 100×10^3 cell/mL (in 100 μ L di mezzo di coltura) e incubate a 37°C. Dopo 24 ore dalla semina, le cellule sono state trattate con MG132 o trasfettate con siRNA, o trattate e silenziate. Ai tempi indicati per ogni esperimento, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di Caspasi-Glo® Reagent, preparato come da protocollo fornito dalla ditta produttrice. La piastra è stata mantenuta in agitazione a 600 rpm per 1 minuto e dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente al riparo dalla luce si è proceduto con la lettura del segnale luminescente mediante lo strumento EnSpire® Multimode Plate Readers (PerkinElmer, Waltham, MA).

I dati sono stati normalizzati per il contenuto di DNA misurato con il kit CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI). Questo kit utilizza un colorante la cui fluorescenza aumenta quando lega il DNA. Al termine della quantificazione delle caspasi, negli stessi pozzetti sono stati aggiunti 100 μ L/well di CellTox™ Green Dye 3X diluito in mezzo completo senza rosso fenolo. La piastra è stata mantenuta in agitazione a 600 rpm per 1 minuto e incubata per 15 minuti al buio a temperatura ambiente prima della lettura. La fluorescenza, proporzionale alla quantità di DNA presente, è stata misurata con lo strumento EnSpire® Multimode Plate Readers (PerkinElmer, Waltham, MA). Per ogni analisi, i campioni sono stati analizzati in triplicato.

3.9 ESTRAZIONE DI RNA, PREPARAZIONE cDNA E ANALISI qPCR

Le cellule SH-Syn e SH-Mock sono state lavate con PBS 1X e lisate con 1 mL di TRIzol Reagent (Fisher Molecular Biology, Rome, IT). L'estrazione e la purificazione dell'RNA è stata eseguita utilizzando il kit commerciale PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, Austin, TX) e l'RNA ottenuto è stato risospeso in 30 μ L di H₂O DEPC contenente 0,2 U/ μ L di RNAsina (Promega, Madison, WI) e quantificato mediante spettrofotometro (Biospectrometer, Eppendorf, Hamburg, DE). La qualità dell'RNA è stata valutata tramite il rapporto tra

l'assorbanza a 260 nm e quella a 280 nm (rapporto ottimale compreso tra 1,8 e 2,0). I campioni di RNA sono stati conservati a -80°C fino al successivo utilizzo.

L'RNA è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando l'enzima RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Per ogni reazione a 500 ng di RNA sono stati aggiunti 0,2 µg di Random Primers, in un volume finale di 12,5 µL. La miscela ottenuta è stata incubata 5 minuti a 65°C. Successivamente sono stati aggiunti 4 µL di Reaction Buffer 5X, 1 mM dNTPs (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) ed 1 µL di RevertAid Reverse Transcriptase, in un volume finale di 20 µL. Ogni reazione è stata, quindi, incubata 10 minuti a 25°C, 60 minuti a 45°C e 10 minuti a 70°C. Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20°C fino al suo utilizzo in qPCR.

Il cDNA è stato amplificato mediante qPCR utilizzando coppie di primer specifiche per i geni da analizzare (Tabella 3.2). Come gene di riferimento per la normalizzazione è stato scelto l'enzima gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite usando 2 µL di cDNA (precedentemente diluito 1:2 con H₂O DEPC-RNAsina), 10 µL di SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Berkley, CA), 0,2 µM di primer Forward e 0,2 µM di primer Reverse specifici per il singolo gene da analizzare, in un volume finale di reazione di 20 µL. Le amplificazioni sono state effettuate con lo strumento MJ Opticon 4 Instrument (MJ Research, Waltham, MA). Il programma impostato prevede 30 secondi a 95°C, seguiti da 5 secondi a 95°C e 30 secondi a 60°C per 40 cicli. Per ogni analisi, i campioni sono stati analizzati in duplicato. La quantità relativa di ogni mRNA è stata calcolata con il metodo $2^{-\Delta Ct}$. Il ΔCt si ottiene sottraendo al ciclo soglia (Ct) del gene target il Ct del gene housekeeper. Il valore ottenuto è utilizzato nella formula $2^{-\Delta Ct}$, che tiene conto sia dell'amplificazione esponenziale tipica di ogni reazione di PCR, sia del fatto che il Ct è raggiunto tanto prima quanto più template era presente nel campione di partenza, quindi a valori più alti corrisponderà una maggiore quantità di mRNA di partenza.

3.10 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DA COLTURE CELLULARI

Per l'estrazione delle proteine, le cellule SH-Syn e SH-Mock sono state lavate 2 volte con PBS 1X e raccolte utilizzando RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100), addizionato di cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE). Il lisato cellulare è stato mantenuto in agitazione a 4°C per 1 ora, quindi centrifugato a 12.000 rpm per 30 minuti a 4°C, al fine di recuperare il surnatante contenente le

proteine solubili. Il pellet è stato risospeso in RIPA addizionato di 2% SDS e vortexato a temperatura ambiente per 30 minuti, seguiti da 45 minuti di centrifuga a 12.000 rpm. Al termine della centrifugazione si è recuperato il surnatante corrispondente alla frazione proteica insolubile in RIPA buffer (contenente solo 1% Triton X-100) ma solubile in RIPA buffer addizionato di SDS al 2%. Il pellet, contenente le proteine insolubili in entrambi i tamponi di lisi, è stato risospeso direttamente in Laemmli buffer (buffer utilizzato in SDS-PAGE per la corsa elettroforetica) addizionato con 100 nM DTT. La concentrazione delle proteine intracellulari solubili in RIPA 1% Triton X-100 o in RIPA 2% SDS è stata determinata mediante il saggio colorimetrico DC Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Per la costruzione della retta di taratura è stata utilizzata albumina serica bovina (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) a una concentrazione compresa tra 0 e 2 mg/mL. L'assorbanza è misurata a 750 nm mediante lo strumento EnSpire[®] Multimode Plate Readers (PerkinElmer, Waltham, MA). Per l'analisi delle proteine extracellulari è stato prelevato 1 mL di mezzo di cultura per ogni condizione sperimentale.

3.11 SDS-PAGE E ANALISI WESTERN BLOT

Per l'analisi WB, 50 µg di proteine intracellulari o 30 µL di mezzo di coltura di ogni campione sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10% o al 14% (SDS-PAGE) e al termine della corsa elettroforetica i campioni sono stati trasferiti (1 ora, 95V) su una membrana in PVDF da 0,45 µm (Millipore, Billerica, MA) precedentemente attivata in metanolo. L'efficienza di trasferimento è stata verificata sottoponendo le membrane a colorazione con colorante Rosso Ponceau S (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) allo 0,1% in 5% acido acetico. Le membrane, dopo essere state incubate per 3 ore a temperatura ambiente con 5% Milk (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) in TTBS, al fine di bloccare i siti di legame aspecifici, sono state ibridate per 16 ore a 4°C con l'anticorpo primario specifico, diluito in 5% Milk, per rilevare la proteina di interesse (Tabella 3.3).

Successivamente, le membrane sono state incubate 1 ora a temperatura ambiente con opportuno anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano, anch'esso diluito in 5% Milk. Le membrane sono state incubate con il substrato chemiluminescente Luminata[™] Crescendo Western HRP Substrate (Millipore, Billerica Ma) ed esposte alle lastre fotografiche Amersham Hyperfilm[™] ECL (GE Healthcare, United Kindom, UK) per rilevare le eventuali bande immunoreattive.

È stata eseguita un'analisi densitometrica delle bande rilevate con l'ausilio del software Quantity One (Bio-Rad, Berkley, CA). I dati presentati rappresentano il rapporto dell'intensità delle bande corrispondenti alle proteine di interesse con quelle della β -actina misurata per lo stesso campione, ognuna corretta per il bianco (valore di densità misurata per il colore di fondo della lastra).

3.12 SAGGIO DI IMMUNOCITOCHIMICA

Per valutare la localizzazione di α Syn le cellule SH-Syn e SH-Mock sono state seminate su vetrino coprioggetto alla densità di 80×10^3 cell/mL e incubate a 37°C. Dopo 24 ore dalla semina, le cellule adese sono state lavate in D-PBS (Lonza, Basel, CH), fissate con 4% paraformaldeide in PBS 1X per 12 minuti, quindi permeabilizzate con 0,1% Triton X-100 in TBS 1X per 12 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver eseguito due lavaggi in D-PBS e lasciato asciugare i vetrini, i vetrini sono stati trasferiti in una camera umida e i siti di legame aspecifici sono stati bloccati incubando le cellule con 5% BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) in D-PBS per 45 minuti a temperatura ambiente. Prima di proseguire con l'ibridizzazione con l'anticorpo primario (Tabella 3.3) anti- α Syn sono stati effettuati due lavaggi con 0,5% BSA in D-PBS. L'anticorpo primario, diluito in 2,5% BSA in D-PBS, è stato lasciato a contatto con le cellule per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 2 lavaggi da 10 minuti con 0,5% BSA in D-PBS, è stata eseguita l'ibridizzazione con opportuno anticorpo secondario fluorescente (Tabella 3.3) per 1 ora, diluito in 2,5% BSA in D-PBS. Dopo due lavaggi da 5 minuti con 0,5% BSA in D-PBS e uno con D-PBS, i nuclei sono stati marcati con il colorante 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) diluito 1:5000 in D-PBS, incubando per 15 minuti a temperatura ambiente al buio. I vetrini coprioggetto sono stati lavati con D-PBS e montati con Mowiol (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) su un vetrino da microscopia. I campioni così preparati sono stati visualizzati mediante microscopia confocale utilizzando il microscopio LSM 510 Meta integrato con la telecamera Axiovert 200 M (Carl Zeiss).

Per valutare la co-localizzazione di α Syn e CLU è stata eseguita una doppia marcatura delle cellule, sia in condizioni normali che in seguito a trattamento con MG132. È stato seguito il protocollo descritto, ma dopo l'ibridizzazione con l'anticorpo secondario, invece di effettuare la colorazione dei nuclei, sono stati effettuati lavaggi da 10 minuti con 0,5% BSA in D-PBS e poi solo in D-PBS, prima di procedere con la seconda marcatura. È stata, quindi, ripetuta la

fase di blocco per 45 minuti in camera umida, seguita dalla marcatura per la rilevazione di CLU e dei nuclei e il montaggio dei campioni su vetrini da microscopia.

3.13 CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

Per valutare l'interazione fisica tra α Syn e CLU, è stato eseguito un esperimento di co-immunoprecipitazione in cellule SH-Syn utilizzando biglie di agarosio derivatizzate con la proteina G (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Dopo aver estratto e quantificato le proteine, per ogni singola reazione di co-immunoprecipitazione 1 mg di proteine totali sono risospesi in 1 mL di RIPA buffer addizionato di inibitori di proteasi e di fosfatasi. La fase di pre-clear, necessaria per eliminare tutte quelle proteine che in maniera aspecifica si legano alle biglie, è eseguita mantenendo il lisato cellulare in rotazione orbitale a 4°C per 30 minuti con 20 μ L di biglie. Al termine dell'incubazione, il lisato viene separato dalle biglie mediante centrifugazione a 2.500 rpm a 4°C per 5 minuti. Il surnatante è trasferito in nuovo tubo e 30 μ L sono prelevati e conservati come campione INPUT. Per permettere il riconoscimento tra proteina e anticorpo, il surnatante è posto in rotazione orbitale a 4°C per 1 ora con 25 μ g di anticorpo anti-CLU. Successivamente si aggiungono 20 μ L di biglie e si protrae la rotazione per 16 ore a 4 °C al fine di consentire il legame tra l'anticorpo e la proteina G presente sulle biglie. Il giorno seguente, quindi, i campioni sono centrifugati a 2.500 rpm a 4°C per 5 minuti, il surnatante (S) contenente le proteine che non interagiscono con quella d'interesse è prelevato e conservato in un nuovo tubo, mentre le biglie leganti l'immunocomplesso (immunoprecipitato) sono lavate quattro volte con 1 mL RIPA contenente inibitori di proteasi e di fosfatasi. Terminati i lavaggi, le biglie sono risospese in una soluzione contenente RIPA addizionato di inibitori di proteasi e di fosfatasi, Laemmli buffer e 100 nM di DTT in un volume finale di 40 μ L. Il reverse cross-link, cioè la rottura dei legami tra anticorpo e biglie, è eseguito ponendo la miscela a 100°C per 5 minuti. Si centrifuga, quindi, a 2.500 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente per separare le biglie dal surnatante contenente le proteine co-immunoprecipitate con quella d'interesse (IP). I campioni sono sottoposti ad analisi WB secondo protocollo descritto precedentemente (paragrafo 3.11).

STUDIO IN VIVO

3.14 ANIMALI

Per la sperimentazione animale descritta in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati animali allevati presso lo stabulario interno dell'Ateneo, mantenuti nel background genetico C57Bl/6. Dall'incrocio di topi C57Bl/6^{Clu+/-}, eterozigoti per l'espressione di CLU, sono stati ottenuti C57Bl/6^{Clu+/+}, di qui in avanti denominati WT e topi C57Bl/6^{Clu-/-}, di qui in avanti denominati CLU-KO, selezionati mediante genotipizzazione su DNA genomico estratto da orecchio e amplificato in PCR usando i primer descritti in Tabella 3.2. Il topo transgenico CLU-KO è un knock-out convenzionale, ottenuto attraverso la generazione di cellule embrionali staminali geneticamente modificate per ricombinazione omologa, con un vettore di rimpiazzo che sostituisce una parte della sequenza al 5' del gene CLU con un gene di selezione¹⁴³. Il fenotipo del topo CLU-KO non è di per sé sofferente e questi animali hanno aspettative di vita analoghe a quelle dei fratelli WT, seppure mostrino una maggiore suscettibilità all'infiammazione¹⁴³. I topi CLU-KO hanno una normale fertilità e l'accoppiamento di animali eterozigoti consente di ottenere un numero di gravidanze, di nascite e di animali svezzati uguali a quello dei fratelli WT. Tutti gli animali sono stati mantenuti in uno stabulario in condizioni ambientali controllate ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, con un ciclo di 12 ore di luce/buio) con libero accesso a cibo e acqua. Le sperimentazioni, autorizzate dal Ministero della Salute, sono state svolte in accordo con quanto prescritto nel del *D. Lgs 26/14*, optando scelte atte a minimizzare e gestire la sofferenza degli animali durante le procedure e nel periodo di stabulazione.

In totale, sono stati usati 66 animali di cui 34 CLU-KO e 32 WT di entrambi i sessi e di età compresa tra i 4 e 12 mesi. Gli animali sono stati utilizzati per diverse analisi, come descritto di seguito:

- 4 animali WT sono stati utilizzati per valutare i livelli di CLU in diverse regioni del cervello;
- 1 animale WT ed un animale CLU-KO sono stati utilizzati per le prove di localizzazione per l'iniezione stereotassica;
- 11 animali WT sono stati utilizzati per individuare il tempo di trattamento con rotenone utile ad innescare il processo neurodegenerativo;

- 49 animali, di cui 16 WT e 33 CLU-KO, sono stati utilizzati per valutare, gli effetti dell'abrogazione di CLU sulla comparsa ed entità della neurodegenerazione.

3.15 GENOTIPIZZAZIONE DEGLI ANIMALI

Per la genotipizzazione dei topi, è stata prelevata una biopsia dal lobo dell'orecchio e successivamente incubata in 20 μ L di buffer di lisi (50mM di Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 0,8 % SDS) addizionato di 1 μ L di Proteinasi K (Promega, Madison, WI, USA) per 2 ore a 56°C. Al termine della digestione la Proteinasi K è stata inattivata incubando i campioni per 10 minuti a 100°C e successivamente alla miscela sono stati aggiunti 180 μ L di H₂O sterile. I campioni sono stati congelati a -20°C fino al successivo utilizzo in PCR.

Per la determinazione del genotipo dei topi il DNA è stato amplificato in PCR usando primers¹⁴³ in grado di discriminare i genotipi di interesse (Tabella 3.2). Brevemente, ad un 1 μ L di DNA di ogni campione sono stati aggiunti 24,1 μ L di una miscela costituita da: 5 μ L di Buffer GoTaq Flexi 5X (Promega, Madison, WI, USA), 2 μ L di MgCl₂ 25 mM, 0,5 μ L di dNTPs 10 mM, 1 μ L di Primers Forward Comune CLU-KO/WT, 1 μ L di primer reverse CLU-KO, 1 μ L di primer reverse WT alla concentrazione di 10 μ M, 0,5 μ L di DMSO, 0,5 μ L di Taq Polimerasi (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 12,5 μ L di H₂O sterile. La PCR è stata realizzata utilizzando il termociclatore GeneAmp PCR System 2700 della Applied Biosystem (ThermoFisher Scientific) impostando un programma di amplificazione che prevede una fase di denaturazione per 5 minuti a 95°C, seguiti da 45 secondi a 94°C, 60 secondi a 63°C e 60 secondi a 72°C per 30 cicli. Al termine dei 30 cicli la temperatura di 72°C viene mantenuta per 5 minuti, prima del raffreddamento a 4°C del campione. I prodotti di amplificazione sono caricati in un gel di Agarosio al 1% (p/v) sciolto in TAE 1X e contenente 0,005% etidio bromuro. La corsa elettroforetica è eseguita a voltaggio costante di 80 V (per circa 1 ora). Al termine, il gel è posto su un transilluminatore (Bio-Rad, Berkley, CA, USA) per visualizzare le bande corrispondenti agli ampliconi ottenuti nella reazione di PCR.

3.16 TRATTAMENTO CON ROTENONE

Il trattamento con rotenone o soluzione veicolo è avvenuto mediante un'iniezione stereotassica monolaterale a livello del fascio mediale del proencefalo. Le coordinate stereotassiche impiegate, in accordo con quanto riportato nell'atlante di cervello di topo di Paxinos e Watson sono le seguenti: da Bregma, AP = -1,2 mm; L = \pm 1,0 mm; DV = -4,7 mm.

I topi sono stati rimossi dalla gabbia uno per volta e anestetizzati mediante isoflurano, facendo uso di un apparato per anestesia gassosa. Una volta accertato lo stato di anestesia profonda (rallentamento della frequenza respiratoria, mancanza di risposte riflesse), l'animale è stato rimosso dalla celletta di anestesia e fissato all'apparato stereotassico. In questa fase l'animale è mantenuto in anestesia mediante l'utilizzo di una mascherina nasale. La testa del topo è stata preparata all'operazione mediante rasatura e disinfezione (Betadine) e si è praticata un'incisione a bisturi della pelle per accedere al cranio, che è stato pulito e asciugato con cura. Con un trapano da dentista è stata effettuata un'apertura del diametro di 1 mm in corrispondenza delle coordinate di iniezione. Mediante l'utilizzo di una siringa Hamilton collegata ad un microiniettore, è stata eseguita l'iniezione di 2 μ L di rotenone in veicolo (1 μ g/ μ L) o di solo veicolo (DMSO:salina:PEG). Terminata la procedura stereotassica, previa sutura della testa, è stato applicato Neufilan gel per ridurre al minimo il dolore locale post-operatorio e il rischio di infezioni. Al termine delle operazioni l'animale è stato rimosso dall'apparato stereotassico e posizionato su un tappeto termico per circa 10 minuti prima di essere riposto nella gabbia di provenienza.

3.17 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DA TESSUTO CEREBRALE DI TOPO, SDS-PAGE E ANALISI WESTERN BLOT

Gli animali destinati alle analisi biochimiche sono stati decapitati mediante l'uso di ghigliottina, previa anestesia profonda con isoflurano. Per ciascun animale il cervello è stato rapidamente prelevato, microdissezionato al fine di ottenere le regioni dell'ippocampo (IPP), del mesencefalo (MES), del Caudato Putamen (CPU) e del Nucleus Accumbens (NAC), e immediatamente congelate.

Per l'estrazione proteica, le regioni ottenute in seguito alla microdissezione del cervello, sono state polverizzate in N₂-liquido mediante l'uso di mortaio e pestello. La polvere ottenuta dal processamento di ogni regione è stata raccolta in 100 μ L di RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100) addizionato di cocktail inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE). Il lisato è stato mantenuto in agitazione a 4°C per 1 ora, quindi centrifugato a 12.300 rpm per 30 minuti a 4°C, al fine di recuperare il surnatante contenente le proteine solubili. La concentrazione delle proteine e l'analisi WB sono state determinate come già descritto nei paragrafi 3.10 e 3.11.

3.18 SAGGIO DI IMMUNOISTOCHEMICA

Per ogni animale destinato alle analisi istologiche, al termine del tempo di trattamento, mantenendo l'animale in anestesia profonda con isoflurano, è stata eseguita la fissazione del cervello attraverso perfusione intracardiaca di 100 mL di fisiologica (0,9% NaCl) preriscaldata a 37°C, seguita da 100 mL di 4% di paraformaldeide per 10 minuti. Terminata la procedura di non risveglio e constatato il decesso dell'animale è stata eseguita l'estrazione del cervello. I campioni sono stati inclusi in paraffina e tagliati al microtomo in fettine; le fettine sono state raccolte su vetrini al fine di procedere con la colorazione immunohistochemica mediante perossidasi di rafano (HRP) e diaminobenzidina (DAB).

L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata da un'incubazione in perossido di idrogeno al 10% a temperatura ambiente. Per prevenire il legame non specifico, le sezioni sono state incubate per 1 ora in 0,1% di Triton X-100 e 1% BSA in PBS 1X. L'anticorpo primario è stato diluito in siero normale di capra all'1%, 0,5% Triton X-100 e PBS e l'incubazione è stata effettuata per 16 ore a 4°C. Al termine dell'incubazione, le sezioni sono state incubate con opportuno anticorpo secondario per 1 ora. Dopo lavaggi in PBS 1X, le sezioni sono state incubate con streptavidina coniugata con HRP (GE Healthcare) a temperatura ambiente per 1 ora. L'attività di HRP è stata visualizzata incubando le sezioni a temperatura ambiente con DAB (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) e 0,01% di perossido di idrogeno, secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Le sezioni, quindi, sono state montate, utilizzando il mezzo Eukitt®, su vetrini in precedenza ricoperti di gelatina e disidratati in etanolo.

3.19 TEST COMPORTAMENTALI

Nei tre giorni precedenti all'inizio dei test comportamentali, i 49 animali utilizzati per valutare gli effetti dell'abrogazione di CLU sulla comparsa ed entità della neurodegenerazione sono stati sottoposti per alcuni giorni ad una fase di "*handling*" della durata di 5 minuti; questa fase consente all'animale di abituarsi alla manipolazione da parte dell'operatore ed ottenere migliori risultati durante l'analisi comportamentale. Brevemente, l'animale viene accarezzato, preso dall'attaccatura della coda (presa routinaria a cui gli animali sono abituati sin dallo svezzamento), sollevato e posto sulle griglie della gabbia in modo da permettergli di far presa con le zampe anteriori. Si procede quindi all'immobilizzazione dell'animale, per pochi secondi, attraverso la presa di sicurezza ad una mano.

3.19.1 Open Field Test

L'Open Field (OF) Test misura la locomozione spontanea e il comportamento ansioso, valutando la tendenza dell'animale a esplorare spazi nuovi e allo stesso tempo a evitare spazi aperti e luminosi. È stata utilizzata un'arena di 50 x 50 cm con pareti nere e pavimento grigio distinta in diverse aree virtuali: centro, periferia ed angoli. Dopo 30 minuti di adattamento alla stanza, l'animale è posizionato al centro dell'arena ed è lasciato libero di muoversi ed esplorare l'ambiente per 10 min. Prima di ogni test l'arena è stata pulita con etanolo al 50% e lasciato evaporare completamente, per evitare che segnali olfattivi esterni potessero condizionare il comportamento esplorativo dell'animale.

L'attività locomotoria è stata analizzata off-line previa registrazione tramite videocamera collegata al sistema di video tracking AnyMaze (San Diego Instruments, <http://www.anymaze.com>). L'analisi è stata condotta valutando la distanza totale percorsa dall'animale e il tempo passato nel centro dell'arena. Un'animale disinibito tenderà a passare più tempo al centro e meno in periferia.

3.19.2 Elevated Plus Maze Test

L'Elevated Plus Maze (EPM) Test misura l'esplorazione in un ambiente nuovo e il grado di ansietà dell'animale. Prevede l'utilizzo di un apparato sollevato di 70 cm dal livello del pavimento costituito da due bracci opposti (lunghezza: 40 cm, larghezza: 9 cm) e due bracci contrapposti (altezza della parete: 15 cm) che si estendono da un quadrato centrale (9 cm per lato). L'animale viene posizionato con la testa rivolta verso un braccio chiuso ed è libero di esplorare l'apparato per 10 minuti. È valutato il tempo passato nel centro, sulle braccia aperte e su quelle chiuse separatamente. Un animale ansioso preferirà esplorare le braccia chiuse che gli appaiono "più sicure".

3.19.3 Kondziela's Inverted Screen Test

Il Kondziela's Inverted Screen Test (IST) è un comune, semplice e rapido test di screening per valutare la forza muscolare ed il coordinamento motorio di un animale. Per l'esecuzione dell'IST, l'animale è stato posizionato su una rete (40 x 40 cm) che è poi capovolta e mantenuta sospesa a 40-50 cm da terra. Il test ha una durata massima di 60 secondi e valuta il tempo che l'animale passa agganciato alle maglie della rete prima di cadere.

3.19.4 Rotational

Il Rotational Test è un test di lateralizzazione che valuta il grado di denervazione a seguito di una lesione monolaterale del sistema nigro-striato dopaminergico. Si svolge in gabbie circolari aventi diametro di 40 cm. Dopo 3 minuti di adattamento alla gabbia, l'animale riceve un'iniezione sottocutanea di apomorfina alla concentrazione di 0.5 mg/Kg, dopodiché viene posizionato di nuovo nella gabbia e registrato per i successivi 20 minuti. Si valuta il numero di rotazioni (complete), in senso orario e antiorario, compiute dall'animale.

3.20 ANALISI STATISTICA

I dati in questo lavoro sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) di esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata eseguita tramite i software Sigma Plot (versione 12.0) e SPSS (versione 25). La differenza fra i gruppi sperimentali confrontati è stata valutata mediante il test *t di Student* per confronti fra due gruppi e test di analisi della varianza ad un fattore (*One-way ANOVA*) seguito dal test *t di Student* per confronti fra due gruppi e da post hoc test di *Bonferroni* per i confronti multipli, come specificato nelle didascalie delle figure riportate nel capitolo Risultati. Per i confronti multipli dei dati della sperimentazione *in vivo*, è stata applicata l'analisi della varianza a due fattori (*Two-way ANOVA*) ed è stata valutata l'interazione fra le due variabili. Le differenze sono ritenute significative per valori di $p < 0,05$.

Tecnica	Primer Forward 5'→3'	Primer Reverse 5'→3'	T° annealing	Cicli
qPCR				
α Syn	CAACAGTGGCTGAGAAGACCA	GCTCCTTCTTCATTCTTGCCCA	60	40
CLU	TGATCCCATCACTGTGACGG	GCTTTTTGCCGTATTCCTGC	60	40
Hsp27	AAGTTTCCTCCTCCCTGTCC	CGGGCTAAGGCTTACTTGG	60	40
Hsp70	GGAGGCGGAGAAGTACA	GCTGATGATGGGGTTACA	60	40
Hsp90	GATAAACCTGACCATTCC	AAGACAGGAGCGCAGTTTCATAAA	60	40
Bip	GCCGTCCTATGTCGCCTTC	TTTGTTTGCCACCTCCAAT	58	40
ATF4	ATGACCGAAATGAGCTTCCTG	CTGGAGAACCCATGAGGTTTG	58	40
CHOP	CTTCTCTGGCTTGGCTGACT	TCCCTTGGTCTTCCTCCTCT	58	40
XBP1-totale	CCTTGTAGTTGAGAACCAGG	GGAAGGGCATTGAAGAACA	58	40
XBP1-us	GCTGAGTCCGGCAGGTGC	GGAAGGGCATTGAAGAACA	58	40
GAPDH	AACCTGCCAAATATGATGAC	TTGAAGTCAGAGGAGACCAC	60	40
Genotipizzazione				
CLU (WT)	ACGATGTGGAAGGATGTGGAAGATGAACAT	TGGTGATGGGCTCTAGTCACCTCCCCTTC	63	30
CLU (CLU-KO)	ACGATGTGGAAGGATGTGGAAGATGAACAT	CTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTG	63	30

Tabella 3.2: Primers utilizzati per le diverse amplificazioni.

	ANTICORPO	Specie	Tecnica e Diluizione
PRIMARI	Anti- α Syn (Clone 42, BD Transduction Laboratories)	Mouse	WB: 1:500 WB (Simple Western): 1:50 ICC: 1:50
	Anti-CLU α (SC-6420, Santa Cruz Biotechnology)	Goat	WB: 1:1.000 ICC: 1:10
	Anti-CLU (05-354 , Millipore)	Mouse	WB (Simple Western): 1:100
	Anti- CLU Human (AF2937, R&D System)	Goat	IP: 25 μ g/mL
	Anti- CLU Mouse (AF2747, R&D System)	Goat	WB: 1:50.000
	Anti-Hsp27 (SC-13132, Santa Cruz Biotechnology)	Mouse	WB: 1:500
	Anti-Hsp70 (ab181606 , Abcam)	Rabbit	WB: 1:2.000
	Anti-Hsp90 (ADI-SPA-830, Enzo Life Sciences)	Mouse	WB: 1:500
	Anti-TH (MAB318, Millipore)	Mouse	WB: 1:1000 WB (Simple Western): 1:100 IHC: 1:1000
	Anti- β actina (ab8224, Abcam)	Mouse	WB (Simple Western): 1:100
Anti- β actina (SC:81178, Santa Cruz Biotechnology)	Mouse	WB: 1:500	
SECONDARI	Anti-Mouse IgG (Sigma)	Sheep	WB: 1:5.000
	Anti-Goat IgG (Sigma)	Rabbit	WB: 1:5.000
	Anti-Rabbit IgG (Sigma)	Goat	WB: 1:200.000
	Anti- Mouse IgG (Alexa Flour TM 488, Invitrogen)	Goat	ICC: 1:300
	Anti- Goat IgG (Alexa Flour TM 488, Invitrogen)	Rabbit	ICC: 1:300
	Anti- Mouse IgG (Alexa Flour TM 568, Invitrogen)	Goat	ICC: 1:300
	Anti- Goat IgG (Alexa Flour TM 568, Invitrogen)	Rabbit	ICC: 1:300
Anti- Mouse IgG (GE Healthcare)	Goat	IHC: 1:200	

Tabella 3.3: Elenco degli anticorpi utilizzati.

4. RISULTATI

STUDIO EX VIVO

4.1. LIVELLI DI CLU, α SYN e TH IN TESSUTI CEREBRALI UMANI DI PAZIENTI AFFETTI DA LBD

Al fine di indagare come varia l'espressione di CLU con il progredire della MP, ne sono stati valutati i livelli proteici, parallelamente a quelli di α Syn e TH, in tessuti cerebrali umani prelevati da pazienti affetti da LBD di vario grado. I casi, selezionati dalla Clinic-Pathological OPTIMA Cohort (Oxford Project to Investigate Memory and Ageing), sono stati suddivisi in 3 gruppi sulla base dello stadio della patologia attribuito dall'esame autoptico: il *gruppo controllo* (n=8) costituito da soggetti sani, il *gruppo pre-sintomatico* (n=6), costituito da pazienti affetti da LBD allo stadio 1-3 della scala di Braak e il *gruppo sintomatico* (n=10) costituito da pazienti affetti da LBD allo stadio 5-6 della scala di Braak.

Le proteine totali solubili sono state estratte dallo striato, una delle regioni maggiormente colpite da queste patologie, e analizzate mediante il sistema Simple Western™, che utilizza un'elettroforesi capillare per identificare e quantificare le proteine.

Dall'analisi emerge come i casi sintomatici abbiano un'espressione della forma secreta di CLU (sCLU) (*Figura 4.1 A*) e pre-secreta (pCLU) (*Figura 4.1 B*) significativamente maggiore sia rispetto al gruppo controllo che ai casi pre-sintomatici. Non vi è, invece, alcuna differenza tra il gruppo controllo e i casi pre-sintomatici. Al contrario, l'analisi di α Syn ha mostrato come i livelli di questa proteina siano significativamente più alti nei casi pre-sintomatici sia rispetto al gruppo controllo che al gruppo sintomatico (*Figura 4.2 A*). Come conferma del processo neurodegenerativo nei casi di LBD è stata anche eseguita un'analisi dei livelli di espressione della Tirosina Idrossilasi (TH), che ha mostrato come vi sia una riduzione significativa di questo marker con il progredire della patologia (*Figura 4.2 B*).

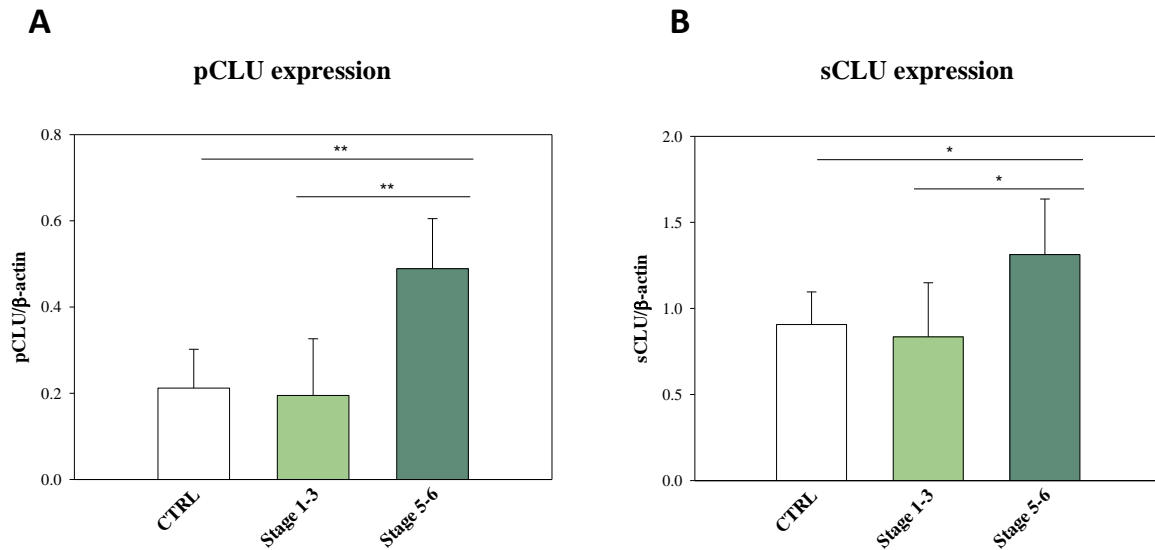


Figura 4.1: Determinazione dei livelli di espressione di CLU in pazienti affetti da LBD.

Analisi densitometrica relativa al precursore (A) e alla forma secreta (B) di CLU in tessuti cerebrali umani di pazienti affetti da LBD a diversi stadi della patologia e casi controllo.

La β -actina è stata usata come controllo del caricamento e normalizzazione dei dati. Le barre d'errore rappresentano la DS relativa all'analisi di 8 controlli sani (CTRL), 6 casi allo stadio 1-3 della scala di Braak e 10 casi allo stadio 5-6 della scala di Braak. (One way ANOVA, seguito dal Test di Bonferroni per i confronti multipli, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$). pCLU = forma pre-secreta di CLU, sCLU = forma secreta di CLU.

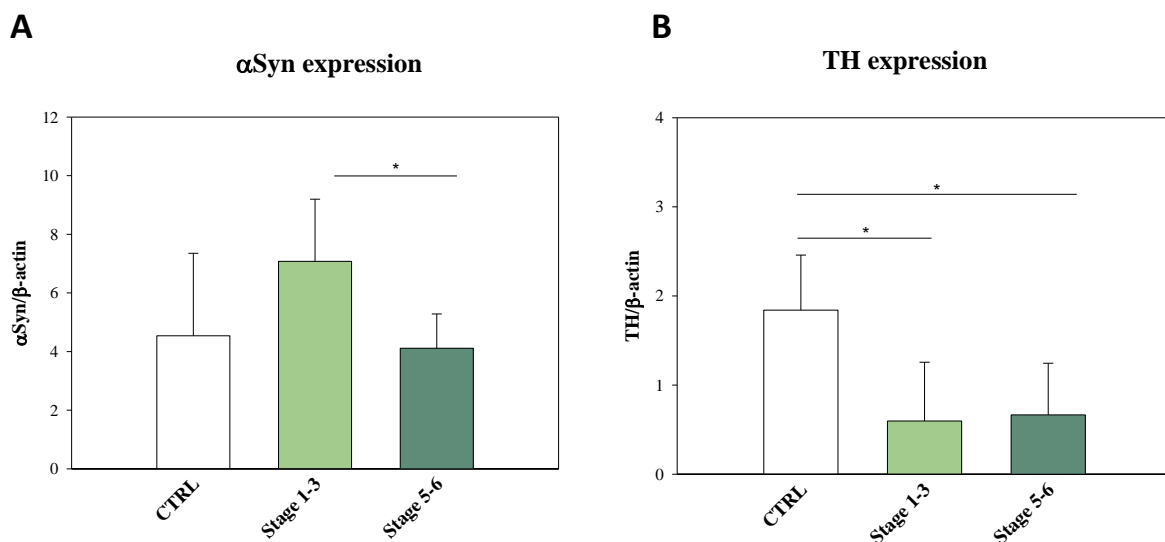


Figura 4.2: Determinazione dei livelli di espressione di α Syn e TH in pazienti affetti da LBD.

Analisi densitometrica relativa ai livelli di espressione di α Syn (A) e TH (B) in tessuti cerebrali umani di pazienti affetti da LBD a diversi stadi della patologia e casi controllo.

La β -actina è stata usata come controllo del caricamento e normalizzazione dei dati. Le barre d'errore rappresentano la DS relativa all'analisi di 8 controlli sani (CTRL), 6 casi allo stadio 1-3 della scala di Braak e 10 casi allo stadio 5-6 della scala di Braak. (One way ANOVA, seguito dal Test di Bonferroni per i confronti multipli * $p < 0,05$).

STUDIO IN VITRO

4.2 CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE SH-SY5Y SOVRAESPRIMENTI α SYN

4.2.1 Trasfezione, selezione clonale, analisi dei livelli di espressione e localizzazione di α Syn

La sovraespressione di α Syn è stata realizzata in cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y. Questa linea cellulare è comunemente utilizzata per lo studio di malattie neurodegenerative e in particolare per lo studio della MP¹⁴⁴.

La sovraespressione stabile di α Syn, SH-Syn, è stata ottenuta mediante trasfezione del plasmide ricombinante contenente la sequenza codificante della proteina (pHM6- α Syn-WT) e successiva selezione antibiotica. In parallelo, con la stessa procedura, sono stati generati cloni di controllo, SH-Mock, impiegando un plasmide privo di inserto (pHM6-mock).

I livelli di espressione di α Syn nella popolazione policlonale sono stati valutati sia come mRNA, mediante PCR quantitativa (qPCR), sia come proteina, mediante analisi WB. I risultati evidenziano un significativo incremento dei livelli di mRNA in SH-Syn rispetto a SH-Mock (Figura 4.3 A).

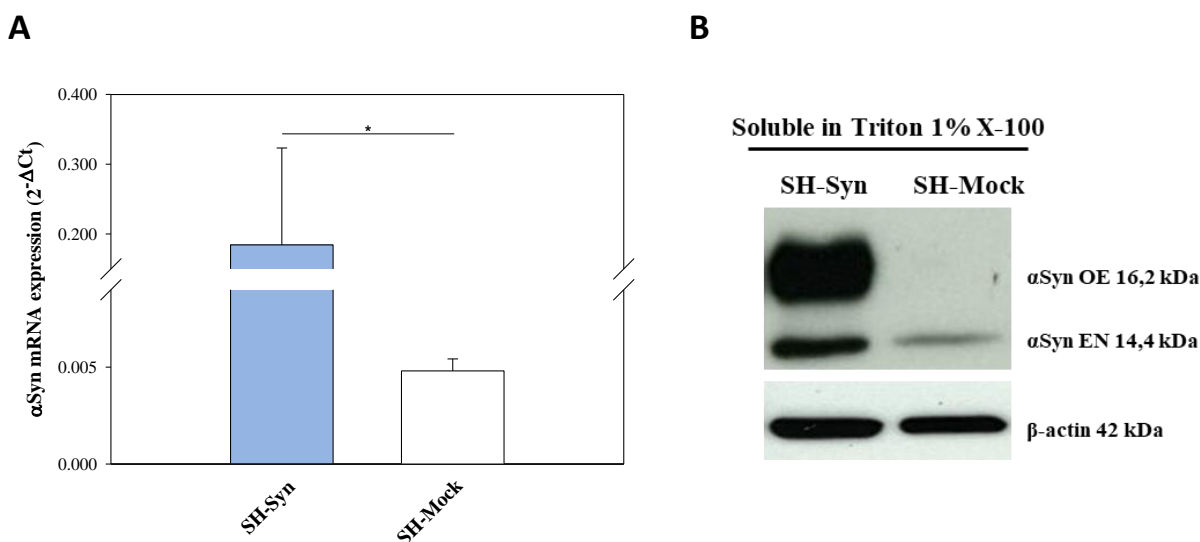


Figura 4.3: Determinazione dei livelli di espressione di α Syn.

(A) Quantificazione dell'mRNA di α Syn mediante qPCR nelle cellule SH-Syn e SH-Mock. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti. (*Test t di Student*, * $p < 0,05$). (B) Analisi WB della proteina α Syn nel lisato cellulare solubile in 1% Triton X-100 delle cellule SH-Syn e SH-Mock.

La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, SH-Mock = SH-SY5Y trasfettate con pHM6-mock, α Syn OE = α Syn sovraespressa esogenamente, α Syn EN = forma endogena di α Syn.

In accordo, l'analisi WB ha mostrato una sovraespressione della proteina nelle cellule SH-Syn rispetto alle SH-Mock. In particolare, nel lisato cellulare solubile in 1% Triton X-100 si osserva la presenza di due bande immunoreattive: la banda con peso molecolare maggiore, pari a 16,2 kDa, identifica la forma ectopicamente sovraespressa di α Syn, mentre la banda corrispondente al peso molecolare minore, pari a 14,4 kDa, rappresenta la forma endogena di α Syn costitutivamente espressa in questa linea cellulare, evidenziabile anche nei lisati cellulari di SH-Mock (*Figura 4.3 B*). Il peso molecolare più alto, corrispondente alla proteina esogena, è dovuto alla presenza di una sequenza di riconoscimento all'estremità N-terminale (HA-tag, YPYDVPDYA) ed una all'estremità C-terminale (His-Tag).

La sovraespressione di α Syn è stata confermata anche mediante saggi di immunocitochimica. Nelle cellule SH-Syn si ha un segnale di fluorescenza verde, relativo all'espressione di α Syn, molto più intenso rispetto a quello visibile nella linea controllo. Tale segnale, per entrambe le linee cellulari, risulta essere confinato al compartimento citosolico (*Figura 4.4*). In nessun caso si osserva co-localizzazione del segnale blu (marcatura dei nuclei con DAPI) e del segnale fluorescente verde relativo a α Syn.

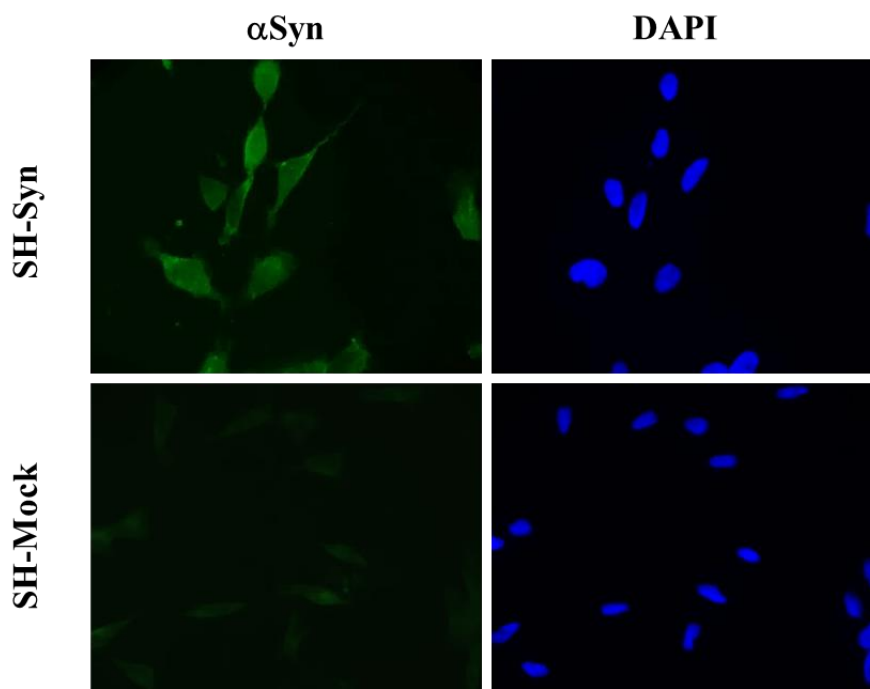


Figura 4.4: Localizzazione cellulare di α Syn.

Analisi immunocitochimica condotta utilizzando un anticorpo anti-SYN (fluorescenza verde) nelle cellule SH-Syn e SH-Mock. I nuclei sono stati colorati con il DAPI. Immagini acquisite con ingrandimento 20X mediante microscopio a fluorescenza.

SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, SH-Mock = SH-SY5Y trasfettate con pHM6-mock.

4.2.2 Analisi della morfologia e della proliferazione del modello cellulare

L'analisi al microscopio ottico in contrasto di fase non ha evidenziato differenze morfologiche tra SH-Syn ed i controlli SH-Mock. Entrambe le popolazioni, invece, sono caratterizzate da una maggiore eterogeneità di forma e dimensioni rispetto alla linea parentale da cui derivano, pur non discostandosi significativamente da essa (*Figura 4.5A*).

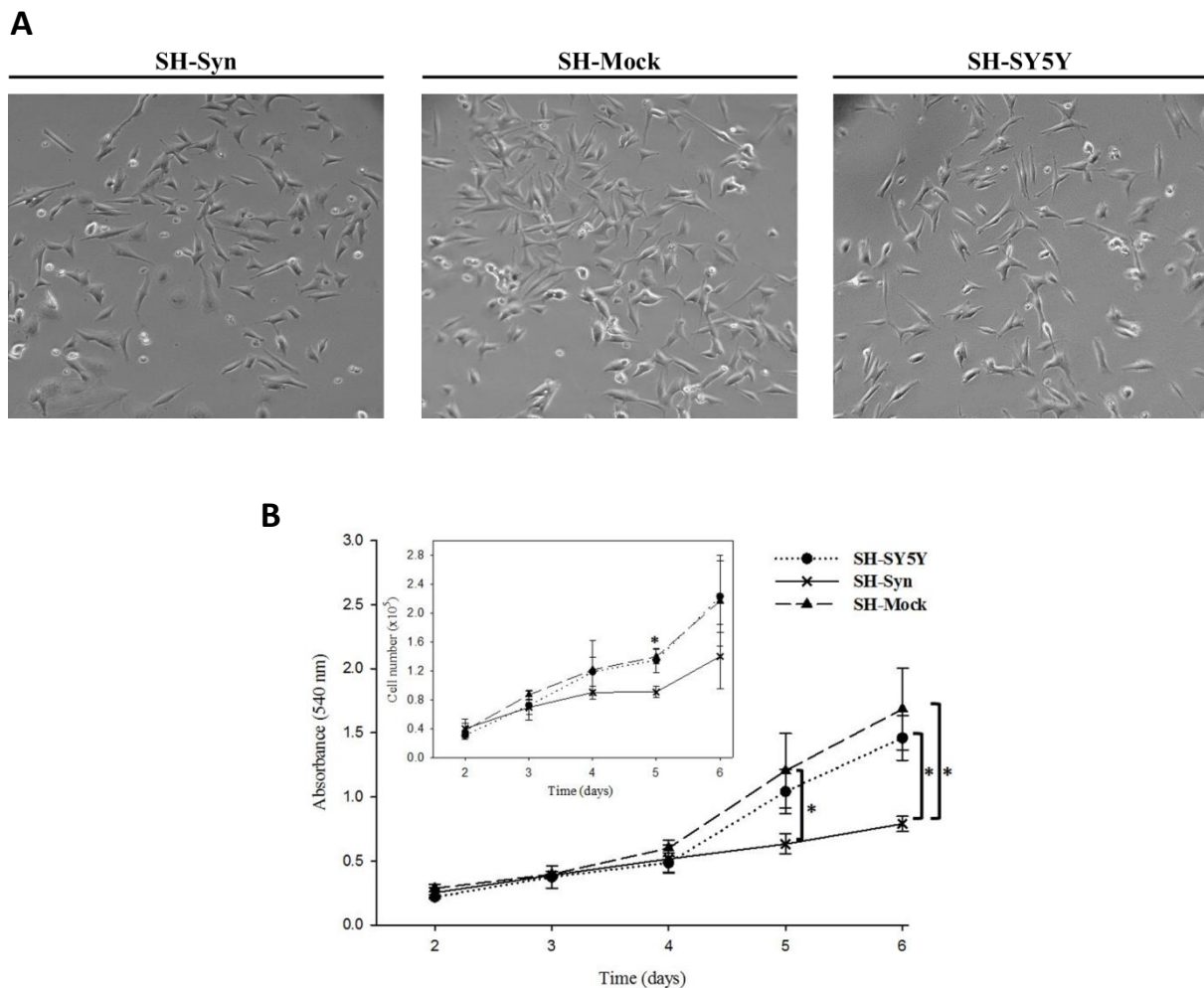


Figura 4.5: Morfologia e Proliferazione.

(A) Immagini in contrasto di fase di cellule SH-Syn, SH-Mock e SH-SY5Y. Immagini acquisite con ingrandimento 20X. (B) Saggio di proliferazione con Cristal Violetto condotto su cellule SH-Syn, SH-Mock e SH-SY5Y.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student* * $p < 0,05$). SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, SH-Mock = SH-SY5Y trasfettate con pHM6-mock.

Per determinare le caratteristiche di velocità di crescita delle cellule SH-Syn e SH-Mock è stato eseguito un saggio di proliferazione cellulare. Dal saggio di proliferazione con cristal violetto emerge che le cellule SH-Syn presentano una crescita più lenta rispetto ai controlli SH-Mock e alle SH-SY5Y. In particolare, l'analisi mostra una differenza statisticamente

significativa tra SH-Syn e SH-SY5Y già dopo 5 giorni dalla semina e tra la linea SH-Syn e SH-Mock dopo 6 giorni dalla semina (*Figura 4.5 B*).

4.2.3 Blocco del proteasoma e induzione di stress proteotossico

Per aumentare l'accumulo intracellulare di α Syn ed aggravare lo stress proteotossico, le cellule sono state trattate con MG132, un inibitore del proteasoma. Al fine di individuare la concentrazione del farmaco in grado di inibire la vitalità cellulare al 50% del valore iniziale dopo 48 h di trattamento ($IC_{50_{48}}$), le cellule SH-Syn e SH-Mock sono state trattate con concentrazioni crescenti di MG132 (da 0 a 2 μ M). La vitalità cellulare è stata valutata dopo 48 ore mediante saggio WST-1. Si è ottenuta una curva dose-risposta in cui si osserva come l'MG132 presenti un effetto citotossico dose-dipendente su entrambe le linee cellulari (*Figura 4.6*). Tramite analisi di regressione non lineare è stata calcolata l' $IC_{50_{48}}$, che è risultata essere pari a 0,4 μ M sia per SH-Syn sia per SH-Mock.

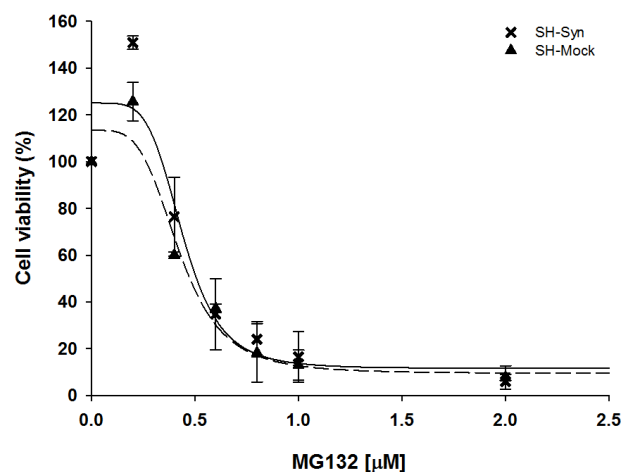


Figura 4.6: Analisi della citotossicità del trattamento con MG132.

Curva dose-risposta del trattamento con MG132 sulla vitalità di cellule SH-Syn e SH-Mock ottenuta mediante saggio WST-1.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti. SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, SH-Mock = SH-SY5Y trasfettate con pHM6-mock.

Per valutare l'effetto del trattamento sui livelli di espressione di α Syn sono state eseguite analisi qPCR e WB. I risultati non hanno evidenziato alcuna variazione dei livelli di mRNA di α Syn nelle SH-Syn trattate (SH-Syn_T) rispetto alle stesse cellule non trattate (SH-Syn_{UT}) (*Figura 4.7 A*). Risultati simili sono stati osservati in cellule SH-Mock trattate (SH-Mock_T). L'analisi WB della frazione cellulare solubile in 1% Triton X-100 non ha evidenziato variazioni significative del livello di α Syn tra SH-Syn_T e SH-Syn_{UT} (*Figura 4.7 B*). Per

contro, la forma monomerica di α Syn, insieme con varie forme oligomeriche ad alto peso molecolare (α Syn HMW), aumentano nella frazione proteica solubile in 2% SDS e nei pellet. α Syn HMW non sono evidenziabili in SH-Mock_T (dati non mostrati). Infine, nei mezzi di coltura di SH-Syn_T risulta ben visibile una banda corrispondente al monomero di α Syn, assente nei mezzi delle cellule SH-Syn_{UT} (Figura 4.7 B).

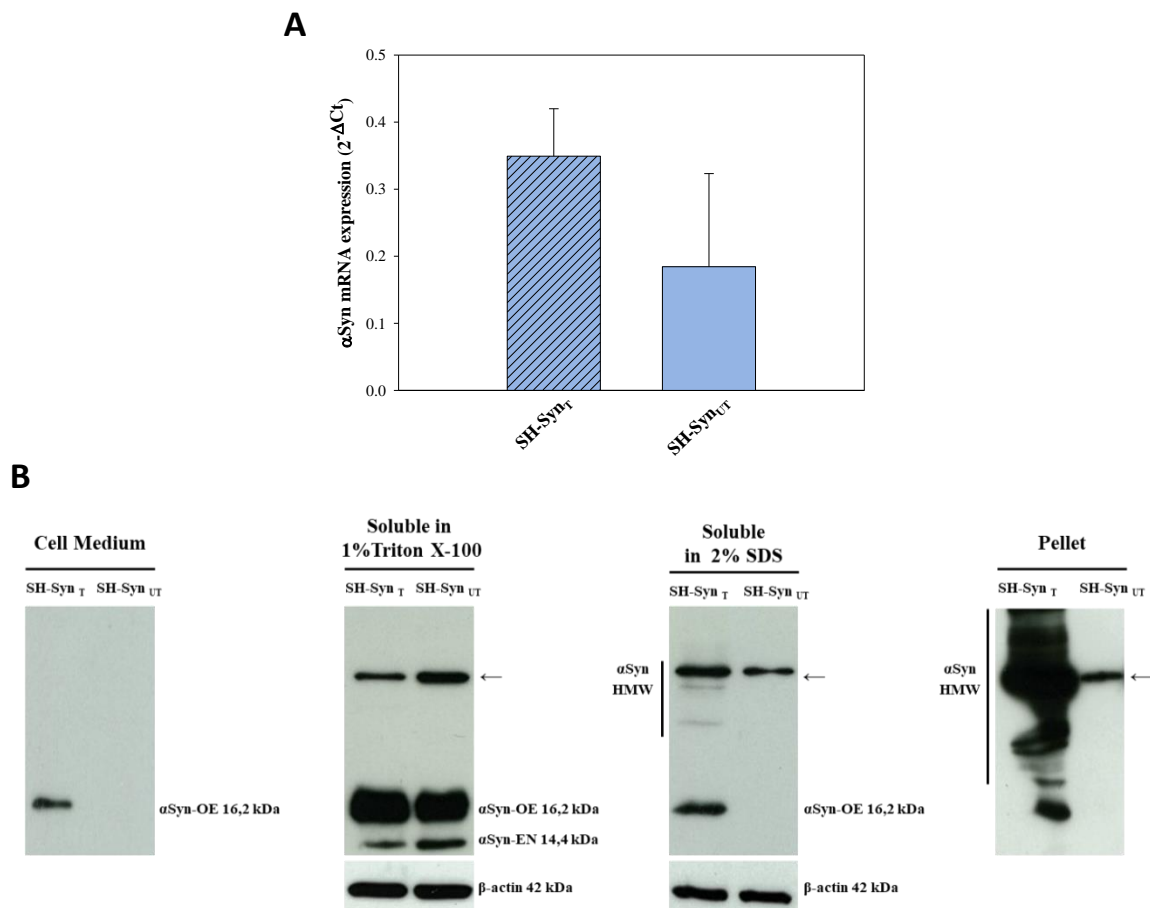


Figura 4.7: Determinazione dei livelli di espressione di α Syn in seguito a trattamento con MG132.

(A) Quantificazione dell'mRNA di α Syn mediante qPCR in cellule SH-Syn_T e SH-Syn_{UT}. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, $p \geq 0,05$).

(B) Analisi WB della proteina α Syn nei mezzi di coltura, nel lisato proteico intracellulare solubile in 1% Triton X-100 e solubile in 2% SDS e nei pellet delle cellule SH-Syn_T e SH-Syn_{UT}.

La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. SH-Syn_T = SH-Syn trattate, SH-Syn_{UT} = SH-Syn non trattate, α Syn OE = forma sovraespressa di α Syn, α Syn EN = forma costitutivamente espressa di α Syn, α Syn HMW = forme ad alto peso di α Syn. → banda aspecifica.

4.2.4 Analisi dei marker dell'UPR

Al fine di valutare l'effetto della sovraespressione di α Syn, in presenza o assenza di trattamento con MG132 sull'induzione dello stress del RE, sono stati misurati i livelli di mRNA di diversi marcatori della risposta cellulare alle proteine non foldate (UPR). L'analisi

ha mostrato che, in assenza di trattamento, il livello di Bip aumenta significativamente nelle cellule SH-Syn rispetto a SH-Mock. La sola sovraespressione di α Syn, tuttavia, non produce una variazione significativa dei livelli di espressione di ATF4, CHOP e del rapporto tra l'espressione di XBP1 totale e XBP1 unconventional spliced (r-XBP1) (Figura 4.8 A).

La stessa analisi è stata condotta anche in seguito al trattamento con MG132 e i risultati hanno evidenziato un aumento significativo dell'espressione di ATF4, CHOP e del rapporto fra l'espressione di XBP1 totale e XBP1 unconventional spliced (r-XBP1) in SH-Syn_T rispetto a SH-Mock_T (Figura 4.8 B).

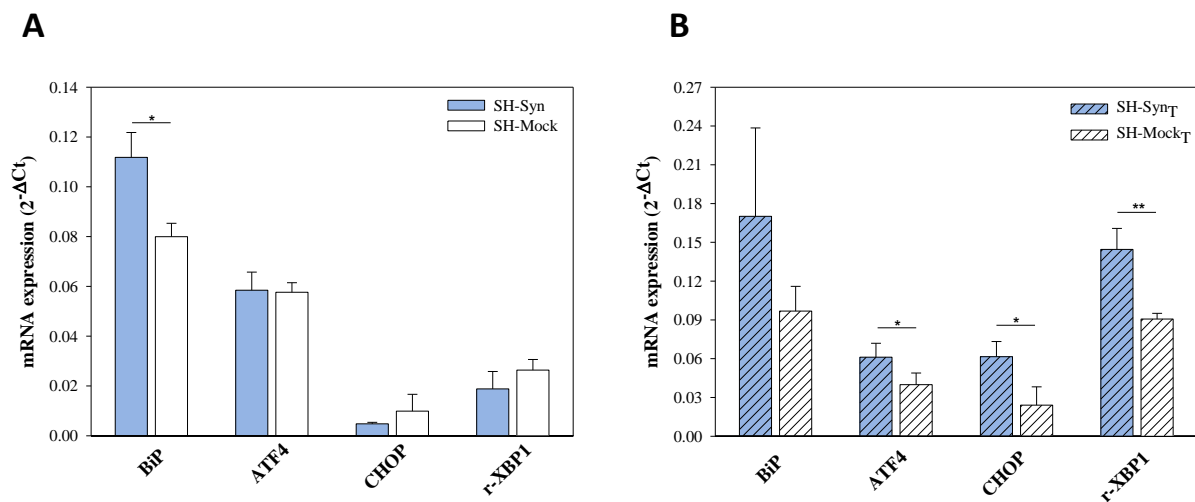


Figura 4.8: Determinazione dei livelli di espressione dei marker dello stress dell'UPR in presenza o assenza di trattamento con MG132.

(A) Quantificazione dell'mRNA dei geni Bip, ATF4, CHOP e del rapporto fra l'espressione di XBP1 totale e XBP1 unconventional spliced mediante qPCR nelle cellule SH-Syn e SH-Mock. (B) Quantificazione dell'mRNA dei geni Bip, ATF4, CHOP e del rapporto fra l'espressione di XBP1 totale e XBP1 unconventional spliced mediante qPCR in SH-Syn_T e SH-Mock_T.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, SH-Mock = SH-SY5Y trasfettate con pHM6-mock, Syn_T = SH-Syn trattate, SH-Mock_T = SH-Mock trattate, r-XBP1 = rapporto tra XBP1 totale e XBP1 unconventional spliced.

4.2.5 Analisi della vitalità cellulare e dell'attività delle caspasi

Al fine di verificare l'effetto della sovraespressione sulla vitalità cellulare, è stata eseguita la conta cellulare con colorante Trypan Blue per entrambe le linee cellulari in presenza e assenza di trattamento. In entrambe le condizioni, la conta cellulare ha permesso di individuare un numero di cellule statisticamente inferiore nella popolazione delle cellule SH-Syn rispetto a quella delle SH-Mock (Figura 4.9 A).

Al fine di indagare se nel modello studiato ci fosse l'attivazione della via apoptotica, sono stati condotti saggi in luminescenza che valutano l'attivazione delle caspasi effettrici, 3/7. L'analisi eseguita in assenza di trattamento ha mostrato come vi sia una maggiore attività delle caspasi 3/7 nelle cellule SH-Syn rispetto alle cellule SH-Mock (*Figura 4.9 B, pannello di sinistra*). La differenza osservata è statisticamente significativa.

Similmente, in seguito al trattamento con MG132 i risultati hanno mostrato come le caspasi effettrici siano significativamente più attive nelle cellule SH-Syn_T rispetto alle cellule SH-Mock_T (*Figura 4.9 B, pannello di destra*).

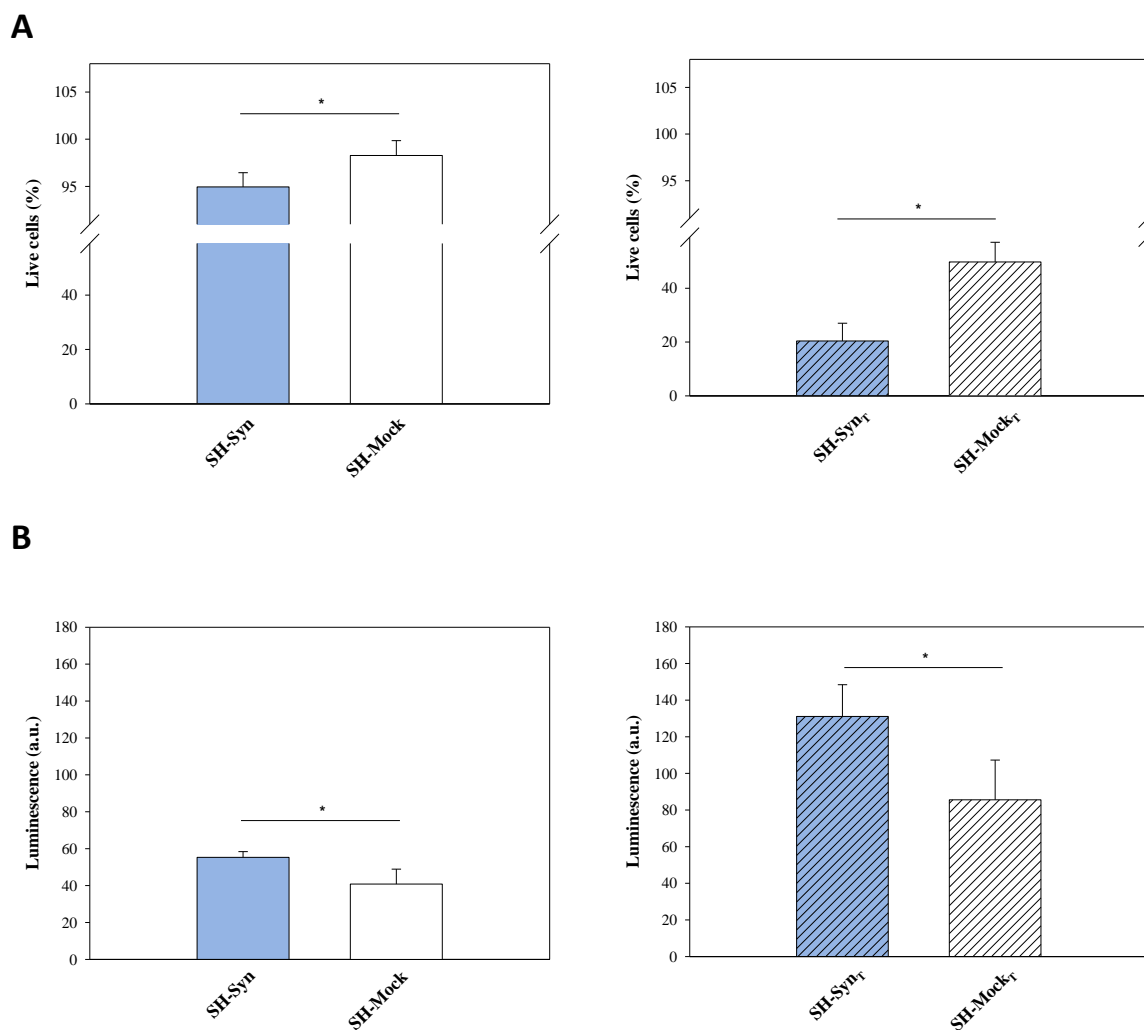


Figura 4.9: Analisi della vitalità cellulare e dell'attività delle caspasi effettrici 3/7 in presenza o assenza di trattamento con MG132.

(A) Conta cellulare con colorante Trypan blue delle cellule SH-Syn e SH-Mock in assenza (*pannello di sinistra*) e in presenza (*pannello di destra*) di MG132. (B) Saggio in luminescenza che valuta l'attività delle caspasi 3/7 effettuato sui cloni SH-Syn e SH-Mock in assenza (*pannello di sinistra*) e in presenza (*pannello di destra*) di MG132.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti. (*Test t di Student* * $p < 0,05$). SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, SH-Mock = SH-SY5Y trasfettate con pHM6-mock, Syn_T = SH-Syn trattate, SH-Mock_T = SH-Mock trattate.

4.3 CLUSTERINA NEI CLONI SH-SYN

4.3.1 Analisi dei livelli di espressione di CLU e altri chaperoni

Per indagare la risposta di CLU alla sovraespressione di α Syn è stato misurato il profilo di espressione di questo chaperone sia a livello di mRNA che di proteina. L'analisi qPCR ha mostrato un significativo aumento di CLU nelle cellule SH-Syn rispetto ai controlli SH-Mock (Figura 4.10 A). L'analisi WB dei lisati proteici ha permesso di evidenziare nelle frazioni intracellulari due bande di peso molecolare diverso, una pari a 64 kDa corrispondente a pCLU e l'altra di circa 37 kDa relativa alla forma sCLU. Nei mezzi di coltura è rilevabile, come atteso, solo la banda corrispondente alla proteina matura e secreta, sCLU. Coerentemente all'aumento del trascritto, l'analisi WB mostra un incremento dei livelli proteici di CLU nelle cellule SH-Syn rispetto alle cellule SH-Mock, nei mezzi di coltura, nelle frazioni proteiche intracellulari solubili in 1% Triton X-100 e 2% SDS e nei pellet (Figura 4.11 A).

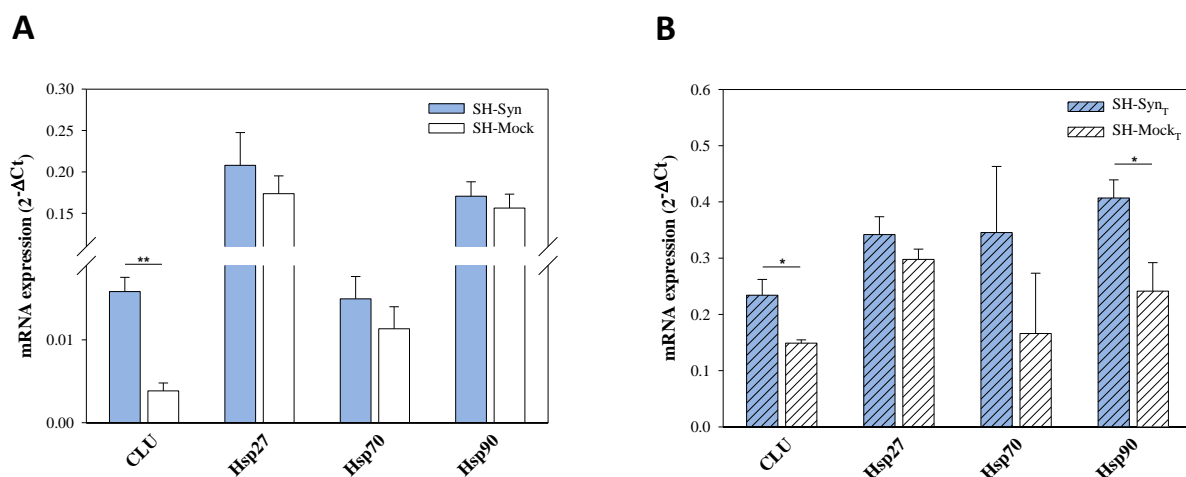


Figura 4.10: Determinazione dei livelli di mRNA di CLU, Hsp27, Hsp70 e Hsp90 in presenza o assenza di MG132.

(A) Quantificazione dell'mRNA mediante qPCR nelle cellule SH-Syn e SH-Mock. (B) Quantificazione dell'mRNA mediante qPCR nelle cellule SH-Syn_T e SH-Mock_T.

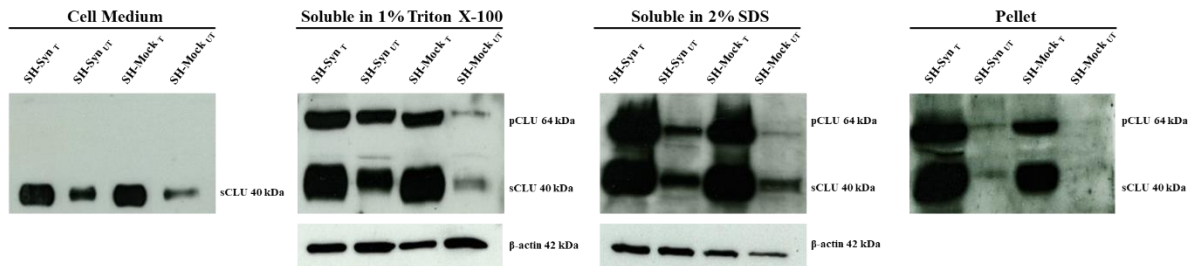
Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student* * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, SH-Mock = SH-SY5Y trasfettate con pHM6-mock, SH-Syn_T = SH-Syn trattate, SH-Mock_T = SH-Mock trattate.

In parallelo, sono state eseguite analisi qPCR e WB per valutare i livelli di espressione di altri chaperoni molecolari studiati in relazione alla MP, ovvero l'Hsp27, l'Hsp70 e l'Hsp90. L'analisi dei trascritti ha mostrato come per nessuno di questi chaperoni vi sia una differenza statisticamente significativa dell'espressione tra le cellule SH-Syn rispetto alle cellule SH-Mock (Figura 4.10 A).

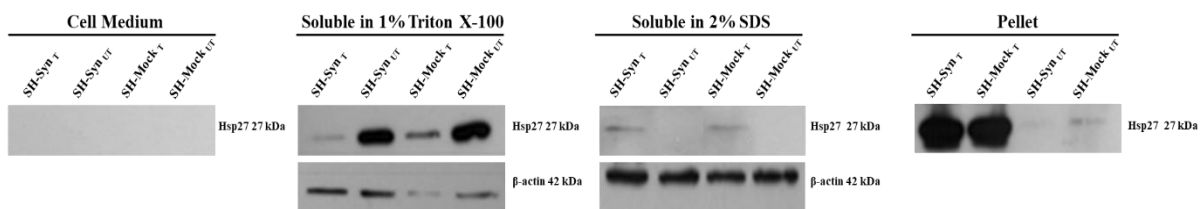
In accordo, anche i livelli di espressione proteica di queste tre HSP non variano a seguito della sola sovraespressione di α Syn, in nessuna delle frazioni intracellulari analizzate. Occorre

tuttavia sottolineare che il WB mostra una riduzione dell'Hsp90 nella frazione intracellulare solubile in 1% Triton X-100 e contemporaneamente un suo leggero aumento nella frazione solubile in 2% SDS. L'analisi condotta sui mezzi di coltura non ha rilevato alcuna banda immunoreattiva per nessuna delle HSP analizzate, come atteso per proteine classificate come chaperoni intracellulari (*Figura 4.11 B, C e D*).

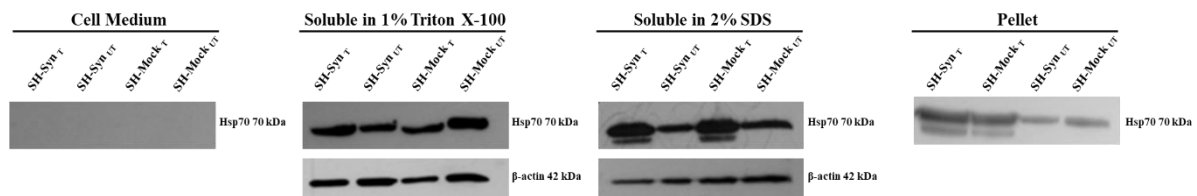
A



B



C



D

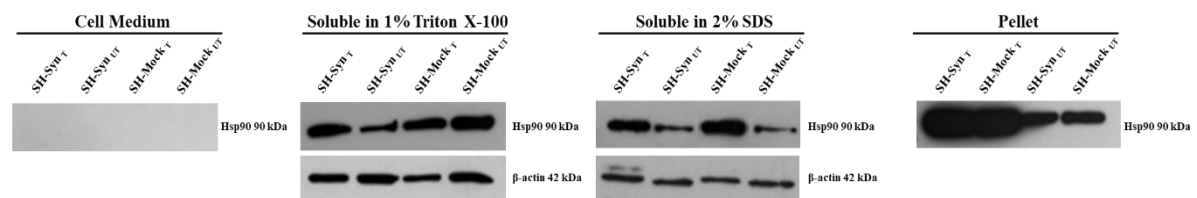


Figura 4.11: Determinazione dei livelli proteici di CLU, Hsp27, Hsp70 e Hsp90 in presenza o assenza di trattamento con MG132.

Analisi WB delle proteine CLU (A), Hsp27 (B), Hsp70 (C), Hsp90 (D) nei mezzi di coltura, nel lisato proteico intracellulare solubile in 1% Triton X-100 o in 2% SDS e nei pellet.

La β-actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. SH-Syn_T = SH-Syn trattate, SH-Syn_{UT} = SH-Syn non trattate, SH-Mock_T = SH-Mock trattate, SH-Mock_{UT} = SH-Mock non trattate, pCLU = forma pre-secreta di CLU, sCLU = forma secreta di CLU.

In seguito al trattamento, è evidenziabile come l'espressione dei trascritti di CLU e dell'Hsp90 aumenti significativamente nelle cellule SH-Syn_T rispetto al controllo SH-Mock_T, a differenza di quanto accade per le altre HSP analizzate (*Figura 4.10 B*). L'analisi WB mostra un aumento dell'espressione di CLU in tutte le frazioni ottenute dalle cellule trattate ed un aumento della secrezione della proteina nei mezzi di coltura. Si deve notare, inoltre, che l'espressione di CLU risulta significativamente più intensa nei pellet ottenuti dalle cellule SH-Syn_T rispetto ai cloni SH-Mock_T, ad indicare un effetto specifico riconducibile alla sovraespressione di α Syn in condizioni di blocco del proteasoma (*Figura 4.11 A*). Per le HSP invece in tutte le frazioni cellulari analizzate non è apprezzabile una differenza tra SH-Syn_T e SH-Mock_T (*Figura 4.11 B, C e D*). Inoltre, anche in condizioni di trattamento è possibile rilevare la loro presenza nei mezzi di coltura (*Figura 4.11B, C e D*).

4.3.2 Analisi immunocitochimica di CLU e α Syn

In accordo con i dati ottenuti in WB, l'analisi immunocitochimica evidenzia un aumento del segnale di fluorescenza riconducibile a CLU nel citoplasma di cellule SH-Syn rispetto ai controlli SH-Mock (*Figura 4.12*). Poiché le analisi WB hanno evidenziato la presenza di forme ad alto peso di α Syn in cellule SH-Syn trattate con MG132, è stato eseguito un saggio di ICC per evidenziare la presenza di aggregati e verificare a questo livello un'eventuale co-localizzazione con CLU. In particolare, in prossimità della membrana cellulare di SH-Syn_T sono rilevabili puntature assenti nelle cellule SH-Syn_{UT} e suggestive della formazione di aggregati proteici insolubili. A questo livello, la co-localizzazione del segnale dell'anticorpo anti-SYN e di quello anti-CLU risulta massima (*Figura 4.13*).

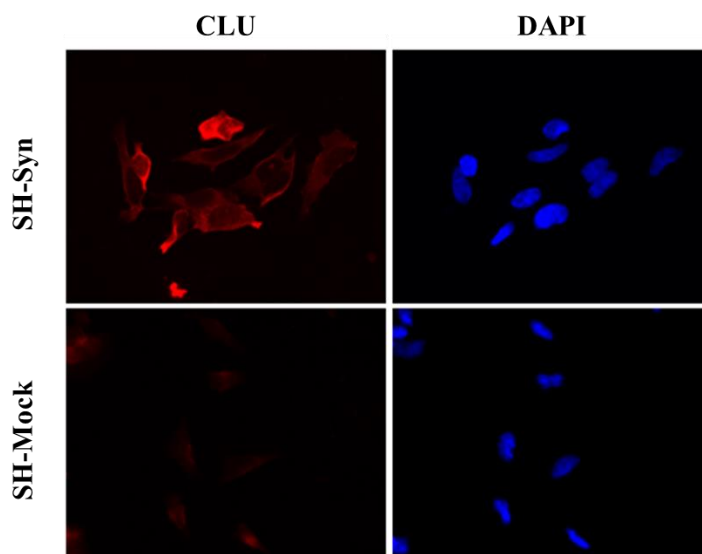


Figura 4.12: Localizzazione cellulare di CLU.

Analisi immunocitochimica condotta utilizzando un anticorpo anti-CLU (fluorescenza rossa) nei cloni SH-Syn e SH-Mock. I nuclei sono stati colorati con il DAPI. Immagini acquisite con ingrandimento 20X mediante microscopio a fluorescenza.

SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, SH-Mock = SH-SY5Y trasfettate con pHM6-mock.

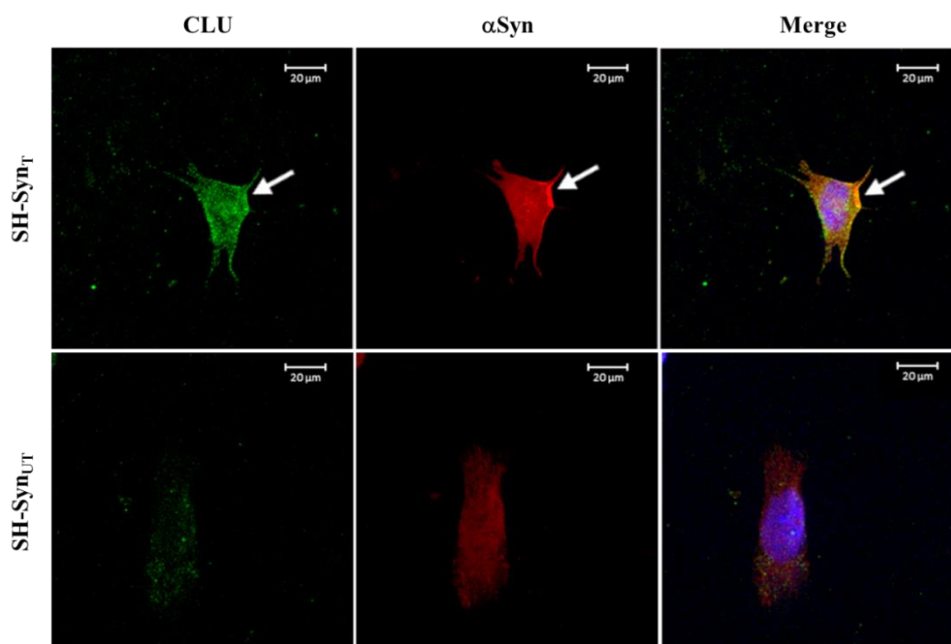


Figura 4.13: Espressione e localizzazione intracellulare di α -Syn e CLU in seguito a trattamento con MG132.

Analisi immunocitochimica condotta utilizzando un anticorpo anti-SYN (fluorescenza rossa) e anti-CLU (fluorescenza verde) nelle cellule SH-Syn_T e SH-Syn_{UT}. I nuclei sono stati colorati con il DAPI.

Immagini acquisite con ingrandimento 40X mediante microscopio confocale. La freccia bianca indica la co-localizzazione delle due proteine in corrispondenza delle puntature in prossimità della membrana. SH-Syn_T = SH-Syn trattate, SH-Syn_{UT} = SH-Syn non trattate.

4.3.3 Interazione tra CLU e α Syn

La co-localizzazione intracellulare di CLU ed α Syn suggerisce l'esistenza di un'interazione diretta fra le due proteine. Per testare questa ipotesi, è stato eseguito un esperimento di co-immunoprecipitazione. Le proteine totali solubili estratte dalle cellule SH-Syn (lisato intracellulare) sono state immunoprecipitate con l'anticorpo anti-CLU, o con un anticorpo anti-IgG (controllo negativo). L'analisi WB, eseguita con un anticorpo anti-CLU sul lisato intracellulare, sul surnatante recuperato dopo l'immunoprecipitazione (S) e sulla frazione immunoprecipitata (IP) ha evidenziato, come atteso, la presenza di CLU nel lisato e l'avvenuta immunoprecipitazione quantitativa di pCLU, presente in IP ed assente in S (*Figura 4.14 A*). Quando le stesse frazioni vengono testate in WB con un anticorpo anti-SYN è possibile riconoscere nella frazione IP una banda corrispondente ad α Syn (*Figura 4.14 B*, *pannello di sinistra*). La co-immunoprecipitazione si deve ad una interazione specifica fra CLU ed α Syn poiché nella frazione IP ottenuta con anticorpo anti-IgG la banda di α Syn è assente (*Figura 4.14 B*, *pannello di destra*).

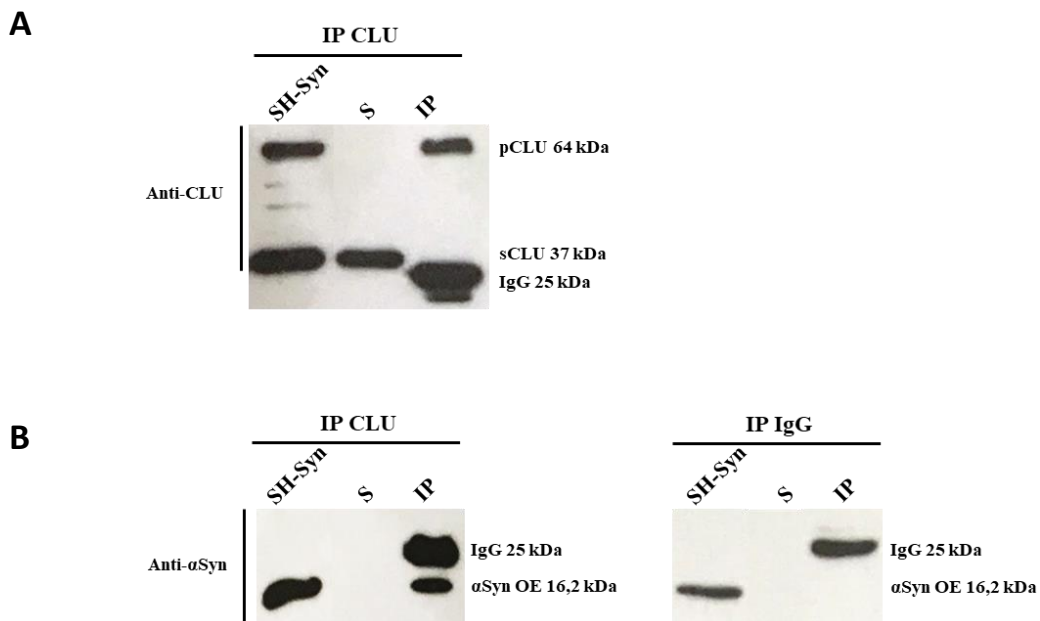


Figura 4.12: Interazione tra CLU e α Syn.

(A) Analisi WB di CLU relativa all'immunoprecipitazione con anti-CLU della frazione intracellulare solubile in 1% Triton X-100 dei cloni SH-Syn. (B) Analisi WB di α Syn relativa all'immunoprecipitazione con anti-CLU (*pannello di sinistra*) e IgG (*pannello di destra*) della frazione intracellulare solubile in 1% Triton X-100 dei cloni SH-Syn.

SH-Syn = SH-SY5Y trasfettate con pHM6- α Syn-WT, S = surnatante non co-immunoprecipitato, IP = frazione immunoprecipitata, pCLU = forma pre-secreta di CLU, sCLU = forma secreta di CLU, α Syn OE = forma sovrarepressa di α Syn.

4.4. EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI CLU IN CELLULE SH-SYN

4.4.1 Analisi dei livelli di espressione di α Syn, Hsp27, Hsp70 e Hsp90

Poiché CLU è up-regolata in cellule SH-Syn, è stato valutato l'effetto del silenziamento di questo gene sull'espressione e aggregazione di α Syn e sull'espressione delle altre HSP analizzate in questo lavoro. Il silenziamento di CLU è stato condotto trasfettando le cellule SH-Syn con un siRNA complementare a una porzione dell'esone 2 di CLU (SH-Syn_{siRNA}). La condizione di controllo è rappresentata da cellule trasfettate con una sequenza che non appaia a nessun mRNA presente all'interno della cellula (SH-Syn_{NC}). L'efficienza di silenziamento di CLU è stata valutata e confermata tramite qPCR e WB (Figura 4.15 A e B).

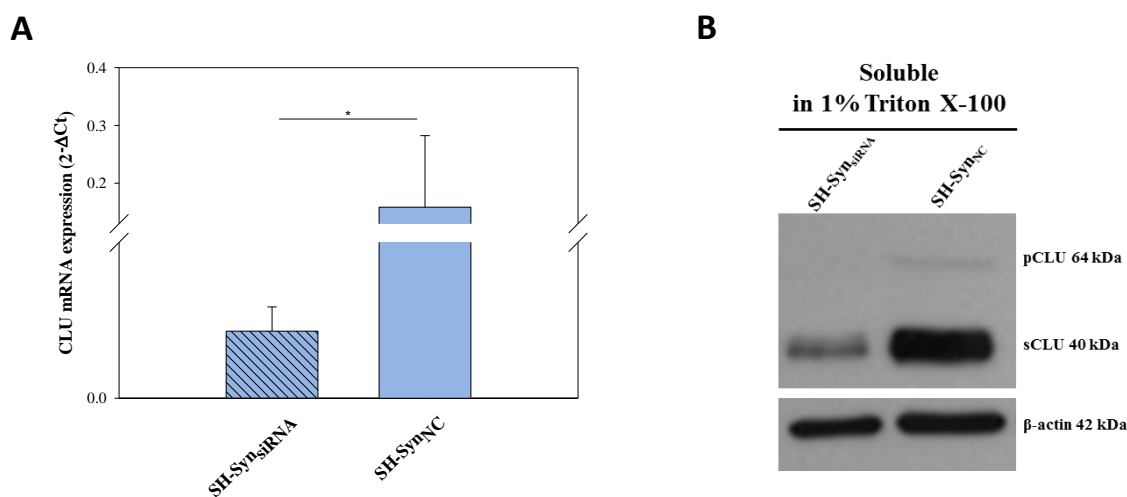


Figura 4.15: Determinazione dell'efficienza di silenziamento di CLU.

(A) Quantificazione dell'mRNA di CLU mediante qPCR nelle cellule SH-Syn_{siRNA} e SH-Syn_{NC}. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, * $p < 0,05$). (B) Analisi WB dei livelli di espressione della proteina CLU nel lisato intracellulare solubile in 1% Triton X-100 delle cellule SH-Syn_{siRNA} e SH-Syn_{NC}.

La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. SH-Syn_{siRNA} = SH-Syn trasfettate con CLU-siRNA, SH-Syn_{NC} = SH-Syn trasfettate con siRNA-NC, pCLU = forma pre-secreta di CLU, sCLU = forma secreta di CLU.

Si è proceduto a valutare se il silenziamento di CLU produce una variazione dei livelli di trascritto a livello di mRNA e di proteina di α Syn e delle HSP analizzate in questo lavoro. L'analisi qPCR non ha evidenziato alcuna variazione significativa nell'espressione di α Syn nelle cellule SH-Syn_{siRNA} rispetto al controllo (Figura 4.16 A). L'espressione della proteina risulta invariata nella frazione solubile in 1% Triton X-100 e nei mezzi di coltura, mentre si rileva un aumento di forme ad alto peso di α Syn nei pellet insolubili delle cellule silenziate (Figura 4.16 B).

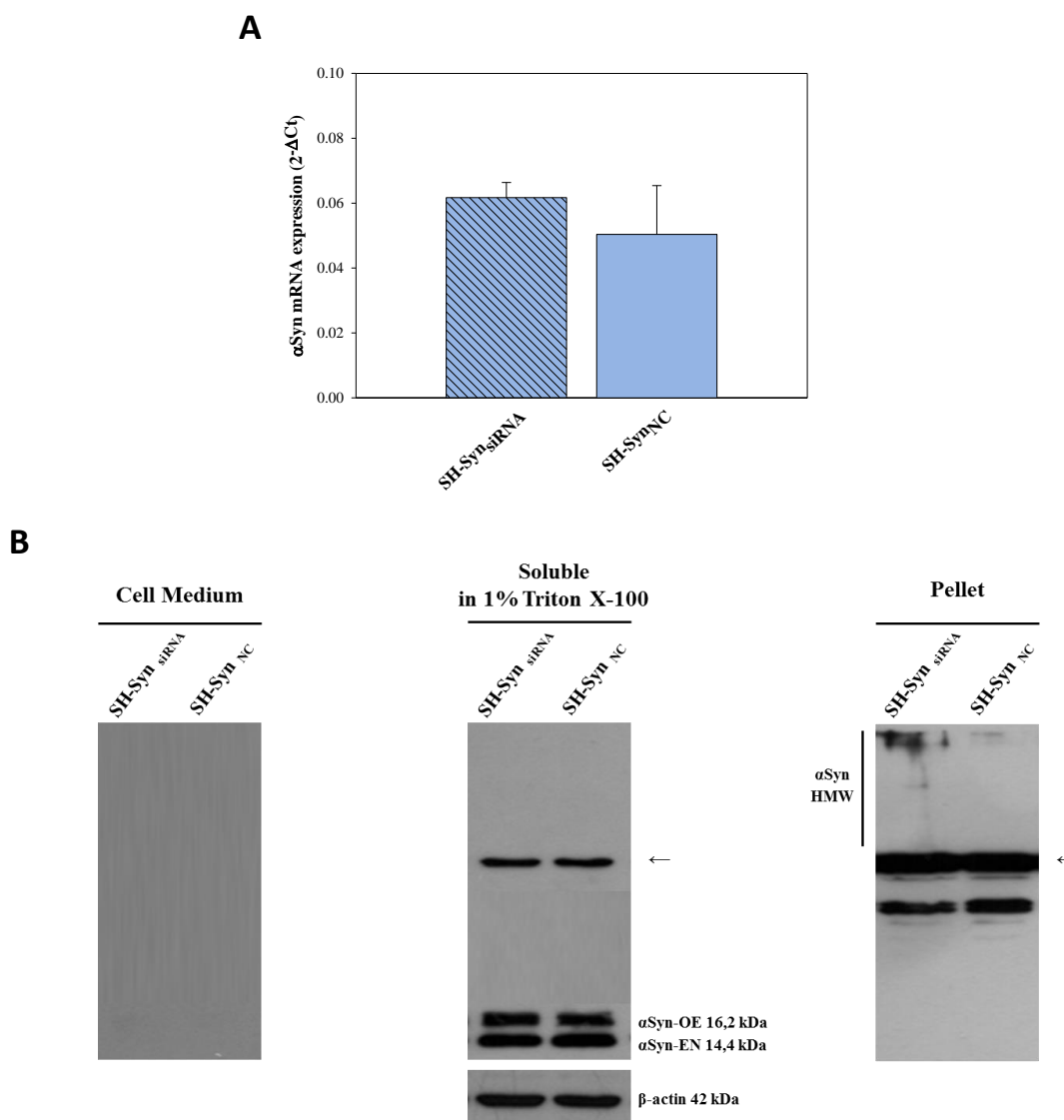


Figura 4.16: Determinazione dei livelli di espressione di α Syn in seguito al silenziamento di CLU.

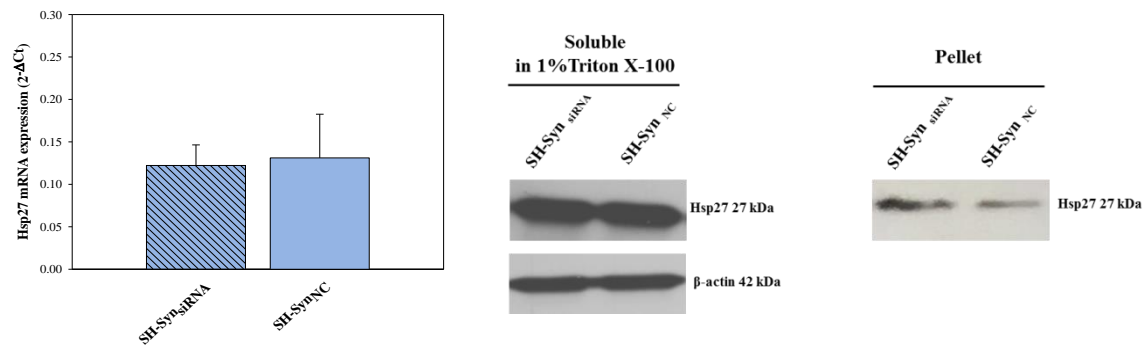
(A) Quantificazione dell'mRNA mediante qPCR nelle cellule SH-Syn_{siRNA} e SH-Syn_{NC}. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, $p \geq 0,05$).

(B) Analisi WB della proteina α Syn nei mezzi di coltura, nel lisato intracellulare solubile in 1% Triton X-100 e nei pellet delle cellule SH-Syn_{siRNA} e SH-Syn_{NC}.

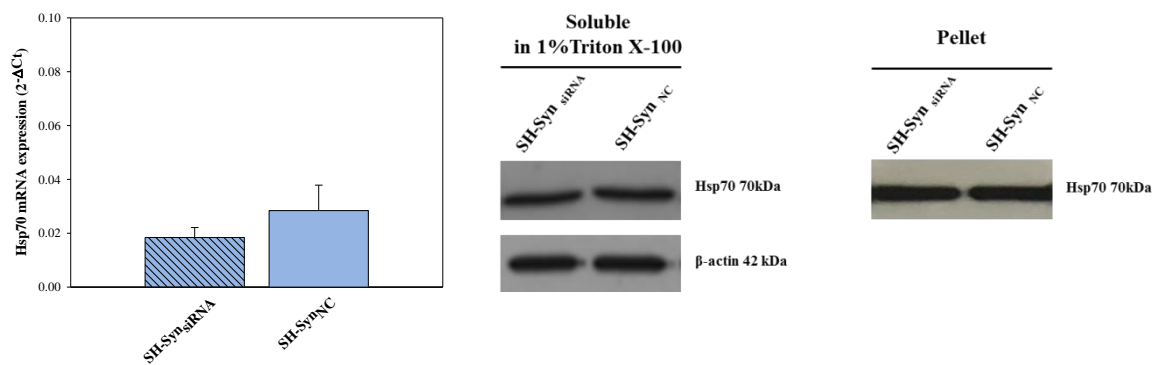
SH-Syn_{siRNA} = SH-Syn trasfettate con CLU-siRNA, SH-Syn_{NC} = SH-Syn trasfettate con siRNA-NC, α Syn OE = forma sovrarepressa di α Syn, α Syn EN = forma costitutivamente espressa di α Syn, α Syn HMW = forme ad alto peso di α Syn. → banda aspecifica.

L'analisi dei trascritti e delle proteine ha mostrato che l'espressione dell'Hsp27 e Hsp70 rimane invariata (*Figura 4.17 A e B*), mentre si osserva una riduzione significativa dell'espressione dell'Hsp90 in cellule SH-Syn_{siRNA} rispetto al controllo (*Figura 4.17 C*).

A



B



C

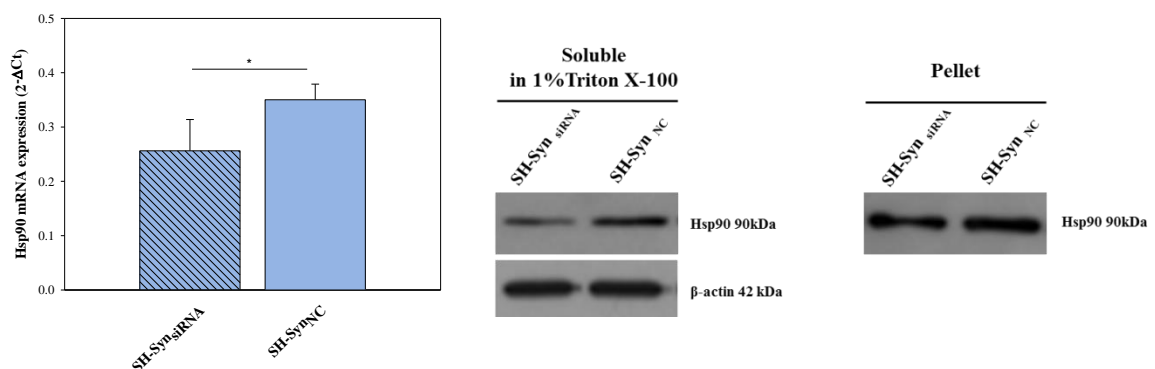


Figura 4.17: Determinazione dei livelli di espressione delle Hsp27, Hsp70 e Hsp90 in seguito al silenziamento di CLU.

Quantificazione dell'mRNA mediante qPCR e analisi WB nel lisato intracellulare proteico solubile in 1% Triton X-100 e nei pellet insolubili delle cellule SH-Syn_{siRNA} e SH-Syn_{NC} di Hsp27 (A), Hsp70 (B) e Hsp90 (C).

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student* * $p < 0,05$). SH-Syn_{siRNA} = SH-Syn trasfettate con CLU-siRNA, SH-Syn_{NC} = SH-Syn trasfettate con siRNA-NC.

4.4.2 Misura dell'UPR, della vitalità e dell'attività delle caspasi

Il silenziamento di CLU non produce variazioni significative del livello di espressione dei marcatori della risposta cellulare alle proteine non foldate in cellule SH-Syn_{siRNA} rispetto alla condizione di controllo SH-Syn_{NC} (Figura 4.18).

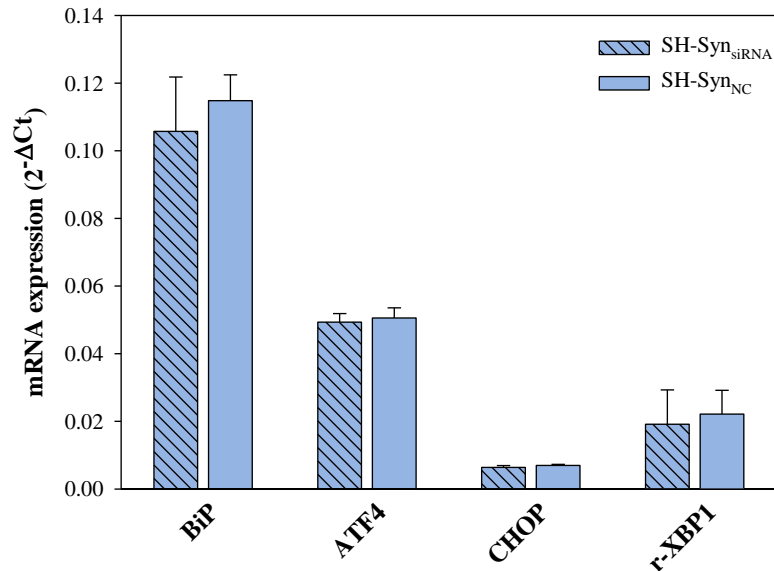


Figura 4.18: Determinazione dei livelli di espressione dei marker dell'UPR in seguito al silenziamento di CLU.

Quantificazione dell'mRNA dei geni Bip, ATF4, CHOP e r-XBP1 mediante qPCR di cellule SH-Syn_{siRNA} e SH-Syn_{NC}.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, $p \geq 0,05$). SH-Syn_{siRNA} = SH-Syn trasfettate con CLU-siRNA, SH-Syn_{NC} = SH-Syn trasfettate con siRNA-NC, r-XBP1 = rapporto tra XBP1 totale e XBP1 unconventional spliced.

Coerentemente, la vitalità delle cellule SH-Syn_{siRNA} non differisce significativamente da quella misurata nelle cellule SH-Syn_{NC} (Figura 4.19 A) e non si osservano variazioni nell'attivazione delle caspasi effettrici 3/7 (Figura 4.19 B).

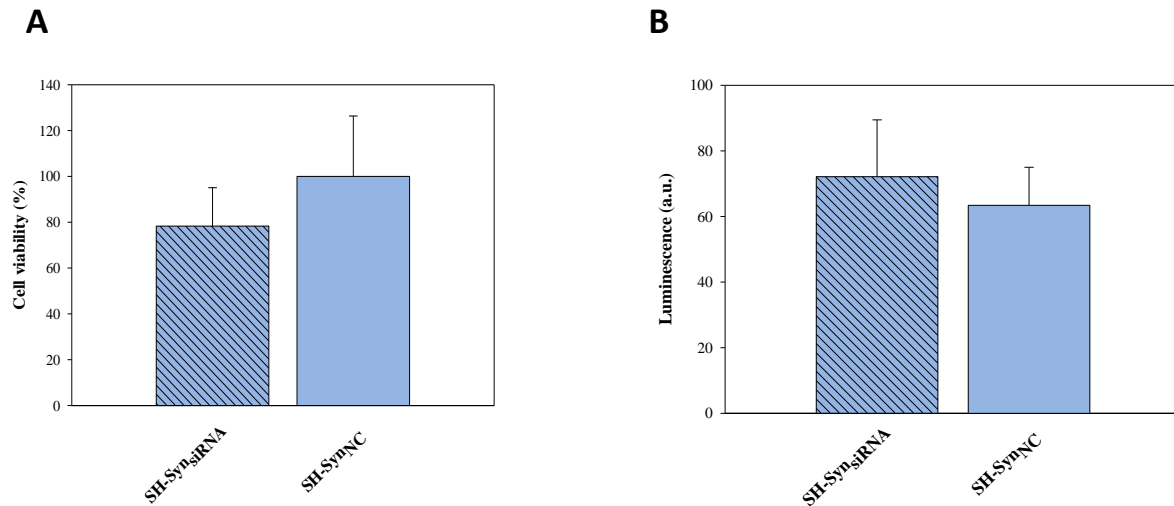


Figura 4.19: Analisi della vitalità cellulare e dell'attività delle caspasi 3/7 in seguito al silenziamento di CLU.

(A) Analisi della vitalità cellulare mediante saggio WST-1 dei cloni delle cellule SH-Syn_{siRNA} e SH-Syn_{NC}. (B) Saggio in luminescenza che valuta l'attività delle caspasi 3/7 effettuato su cellule SH-Syn_{siRNA} e SH-Syn_{NC}.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, * $p < 0,05$). SH-Syn_{siRNA} = SH-Syn trasfettate con CLU-siRNA, SH-Syn_{NC} = SH-Syn trasfettate con siRNA-NC.

4.5 EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI CLU IN CELLULE SH-SYN TRATTATE CON MG132

4.5.1 Analisi dei livelli di espressione di α Syn, Hsp27, Hsp70 e Hsp90

I risultati precedentemente esposti hanno evidenziato che la formazione di aggregati insolubili ad alto peso molecolare e la fuoriuscita di α Syn nei mezzi possono essere ottenuti solo trattando le cellule SH-Syn con MG132. Pertanto, in questa condizione, sono stati testati gli effetti del silenziamento di CLU sull'espressione di α Syn e su quella degli altri chaperoni, analizzati in questo lavoro. A tale scopo, le cellule SH-Syn sono state trasfettate con la sequenza siRNA specifica per CLU e successivamente sono state trattate per 24 ore con MG132 0,4 μ M. Si è reso necessario ridurre la durata del trattamento da 48 ore a 24 ore per limitare la tossicità cellulare derivante dalla combinazione tra trasfezione e blocco del proteasoma. Dopo aver confermato il silenziamento di CLU tramite qPCR e WB (Figura 4.20 A e B) sono stati misurati i livelli di espressione di α Syn, Hsp27, Hsp70 e Hsp90 sia a livello di mRNA che di proteina.

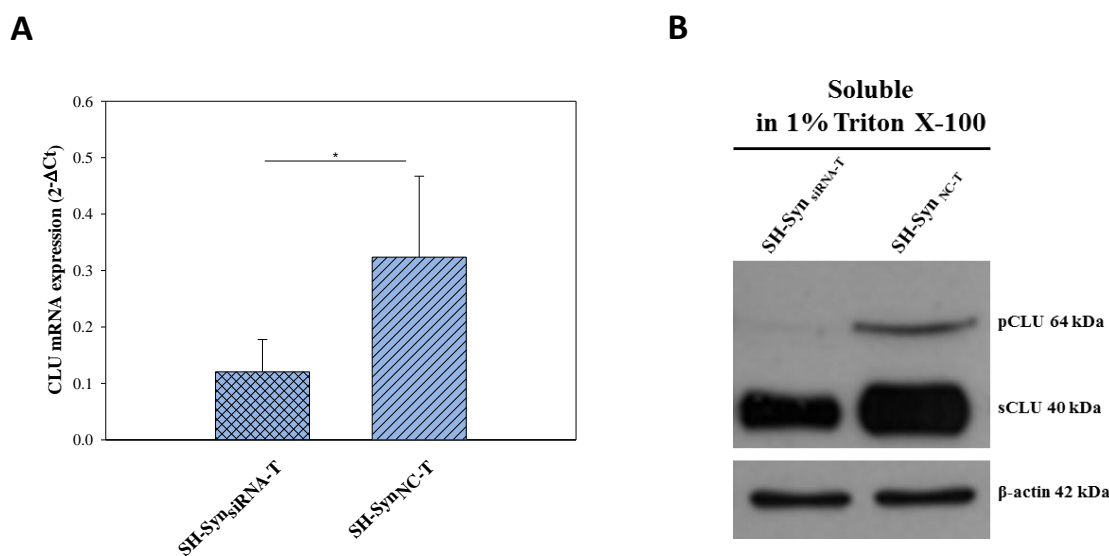


Figura 4.20: Determinazione dell'efficienza di silenziamento di CLU in cellule SH-Syn trattate con MG132.

(A) Quantificazione dell'mRNA di CLU mediante qPCR in cellule SH-Syn_{siRNA-T} e SH-Syn_{NC-T}. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, * $p < 0,05$). (B) Analisi WB dei livelli di espressione della proteina CLU nel lisato intracellulare solubile in 1% Triton X-100 delle cellule SH-Syn_{siRNA-T} e SH-Syn_{NC-T}.

La β -actina è stata utilizzata come controllo del caricamento. SH-Syn_{siRNA-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-CLU, SH-Syn_{NC-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-NC, pCLU = forma pre-secreta di CLU, sCLU = forma secreta di CLU.

L'espressione del trascritto di α Syn delle cellule sovraesprimenti silenziate e trattate (SH-Syn_{siRNA-T}) è confrontabile con quello del controllo, ossia cellule non silenziate ma trattate (SH-Syn_{NC-T}) (Figura 4.21 A).

L'espressione della proteina, misurata nei mezzi di coltura e nella frazione solubile in 1% Triton X-100 di cellule SH-Syn_{siRNA-T}, non varia significativamente rispetto al controllo. È rilevante, invece, l'aumento dell'intensità delle bande corrispondenti a forme HMW di α Syn evidenziabile nei pellet delle cellule SH-Syn_{siRNA-T} rispetto a SH-Syn_{NC-T} (Figura 4.21 B).

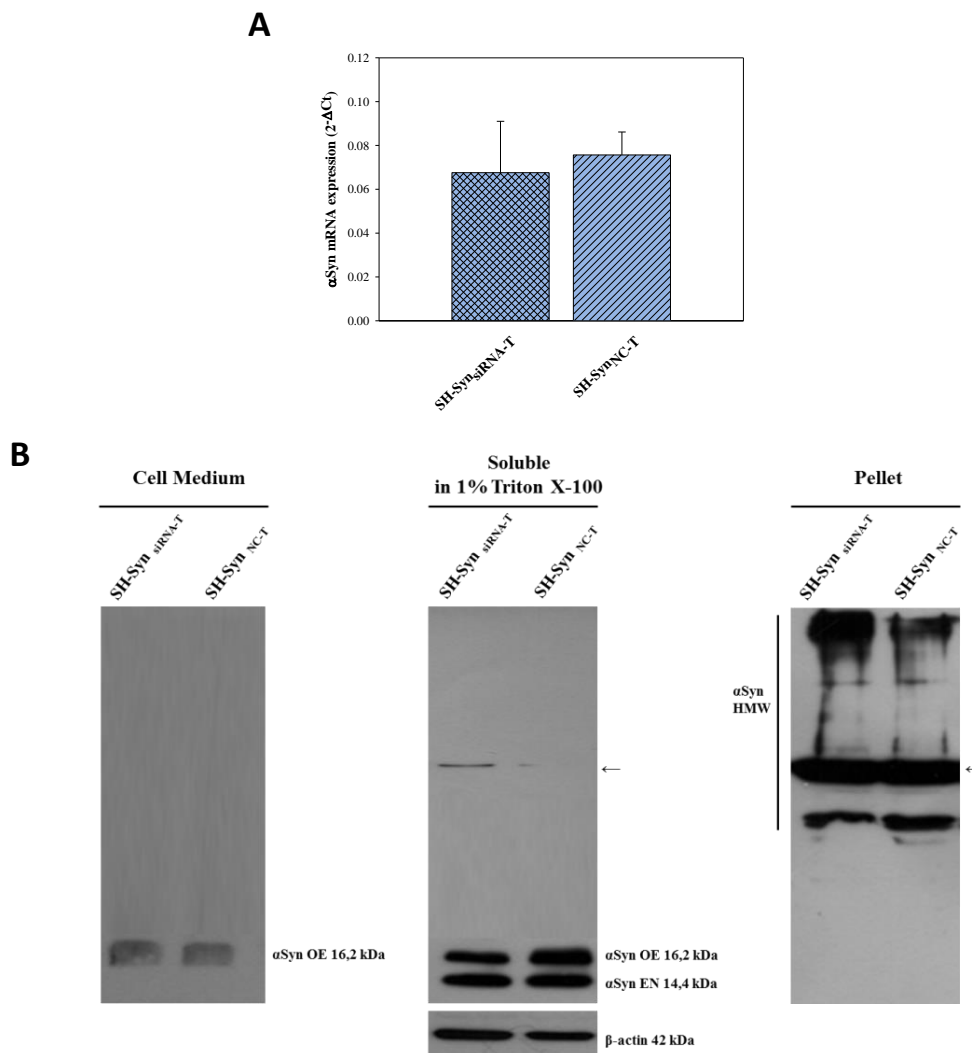


Figura 4.21: Effetti del silenziamento di CLU sull'espressione di α Syn in cellule SH-Syn trattate con MG132.

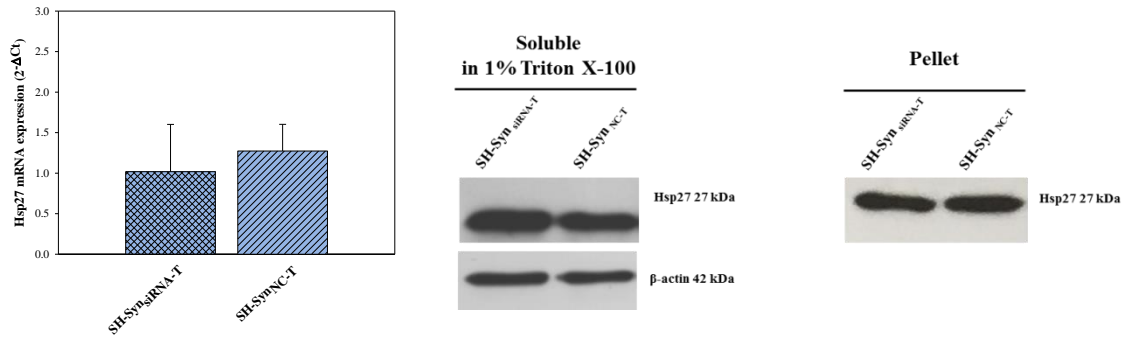
(A) Quantificazione dell'mRNA mediante qPCR nelle cellule SH-Syn_{siRNA-T} e SH-Syn_{NC-T}. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, $p \geq 0,05$).

(B) Analisi WB della proteina α Syn nei mezzi di coltura, nel lisato intracellulare solubile in 1% Triton X-100 e nei pellet delle cellule SH-Syn_{siRNA-T} e SH-Syn_{NC-T}.

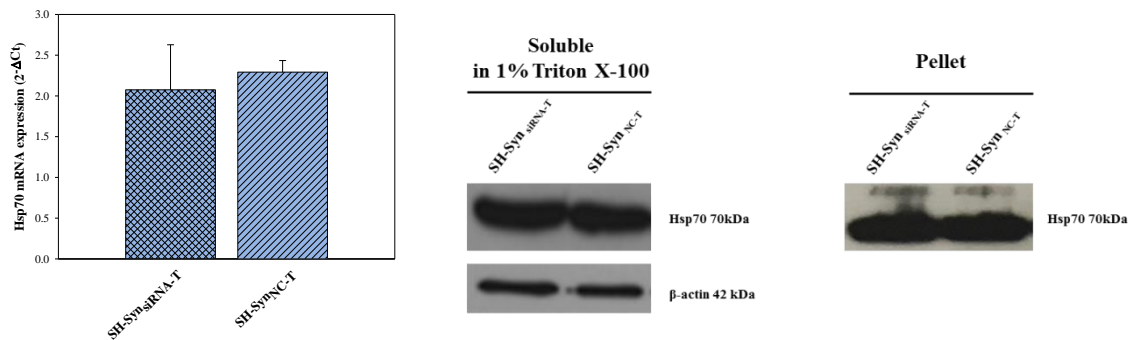
SH-Syn_{siRNA-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-CLU, SH-Syn_{NC-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-NC, α -Syn OE = forma sovraespressa di α -Syn, α Syn EN = forma costitutivamente espressa di α Syn, α Syn HMW = forme ad alto peso di α Syn. → banda aspecifica.

L'analisi dei trascritti e delle proteine relative alle tre HSP analizzate non ha mostrato nessuna variazione significativa della loro espressione confrontando le cellule SH-Syn_{siRNA-T} e le cellule SH-Syn_{NC-T} (Figura 4.22 A, B e C).

A



B



C

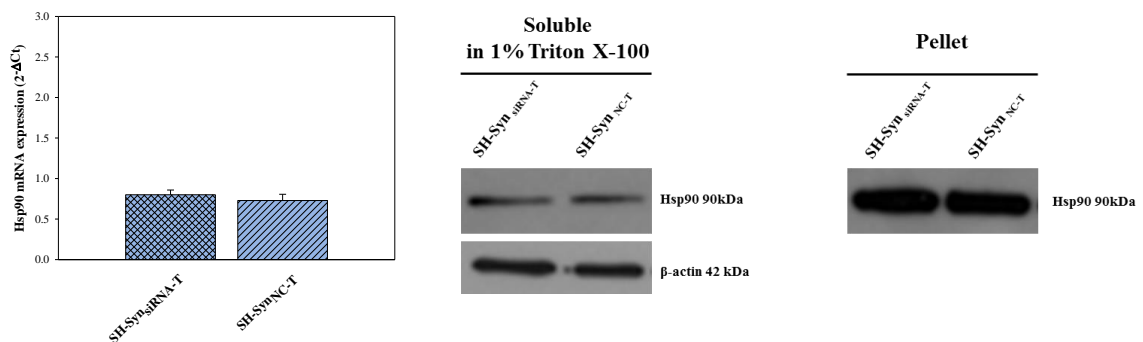


Figura 4.22: Effetti del silenziamento di CLU sull'espressione di Hsp27, Hsp70 e Hsp90 in cellule SH-Syn trattate con MG132.

Quantificazione dell'mRNA mediante qPCR e analisi WB di Hsp27 (A), Hsp70 (B) ed Hsp90 (C) nel lisato intracellulare solubile in 1% Triton X-100 e nei pellet delle cellule SH-Syn_{siRNA-T} e SH-Syn_{NC-T}.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student*, $p \geq 0,05$). SH-Syn_{siRNA-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-CLU, SH-Syn_{NC-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-NC.

4.5.2 Misura dell'UPR, della vitalità e dell'attività di caspasi

Il silenziamento di CLU determina un aumento significativo dell'espressione di Bip nelle cellule SH-Syn_{siRNA-T} rispetto alla cellule controllo SH-Syn_{NC-T}, mentre non ha alcun effetto sull'espressione degli altri marker analizzati (Figura 4.23).

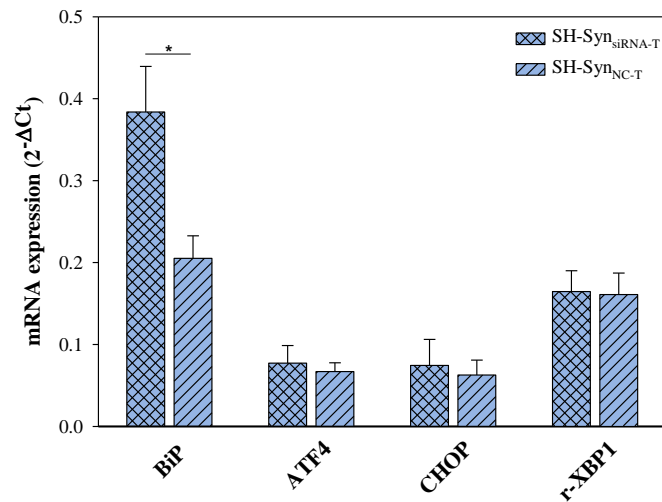


Figura 4.23: Effetti del silenziamento di CLU sull'espressione di marker dell'UPR in cellule SH-Syn trattate con MG132.

(A) Quantificazione dell'mRNA dei geni Bip, ATF4, CHOP e r-XBP1 mediante qPCR nei cloni SH-Syn_{siRNA-T} e SH-Syn_{NC-T}.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti (*Test t di Student* * $p < 0,05$). SH-Syn_{siRNA-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-CLU, SH-Syn_{NC-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-NC, r-XBP1 = rapporto tra XBP1 totale e XBP1 unconventional spliced.

I risultati del saggio WST-1 non evidenziano differenze in termini di vitalità tra le cellule SH-Syn_{siRNA-T} e le cellule controllo SH-Syn_{NC-T} (Figura 4.24 A). In accordo con il dato di vitalità, il silenziamento di CLU non produce differenze significative nell'attività delle caspasi (Figura 4.24B).

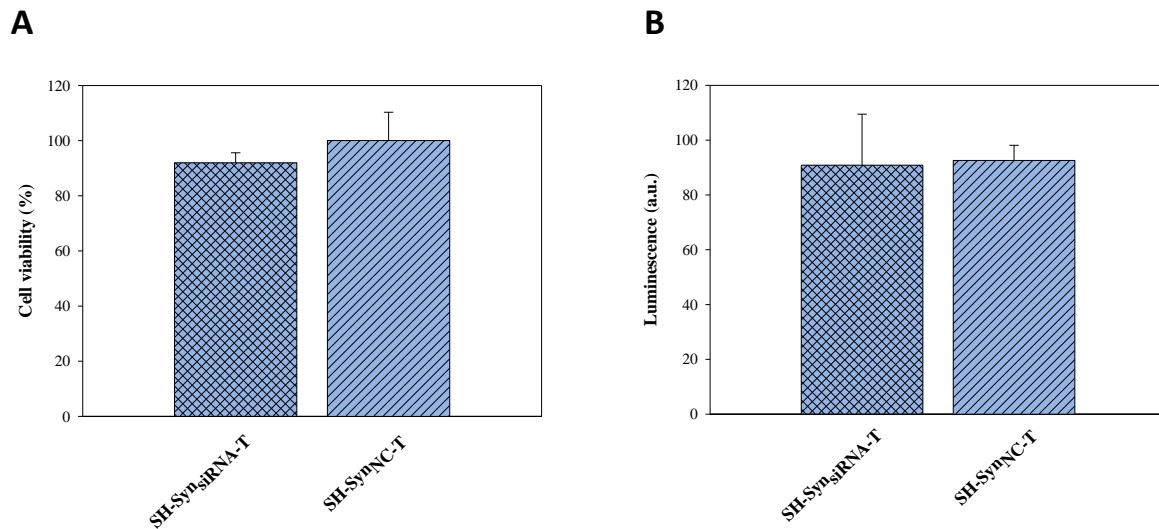


Figura 4.24: Effetti del silenziamento di CLU sulla vitalità cellulare e sull'attività delle caspasi 3/7 in cellule SH-Syn trattate con MG132

(A) Analisi della vitalità cellulare mediante saggio WST-1 delle cellule SH-Syn_{siRNA-T} e SH-Syn_{NC-T}. (B) Saggio in luminescenza che valuta l'attività delle caspasi 3/7 effettuato sulle cellule SH-Syn_{siRNA-T} e SH-Syn_{NC-T}.

Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di dati ottenuti da tre esperimenti differenti, (*Test t di Student*, $p \geq 0,05$). SH-Syn_{siRNA-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-CLU, SH-Syn_{NC-T} = SH-Syn trattati e trasfettati con siRNA-NC.

STUDIO IN VIVO

4.6 ESPRESSIONE DI CLU IN DIVERSE REGIONI DEL CERVELLO MURINO

La sperimentazione *in vivo* è stata condotta in collaborazione con il Prof. Michele Zoli dell'Università di Modena e Reggio Emilia. Prima di procedere con le analisi utili per valutare l'influenza di CLU sul processo neurodegenerativo e sulla comparsa di sintomi motori e comportamentali, sono stati misurati i livelli di espressione di CLU in diverse regioni del cervello. 4 topi WT di entrambi i sessi sono stati sacrificati all'età di 3 mesi e il cervello, prelevato *post-mortem*, è stato rapidamente microdissezionato nelle regioni ippocampo (IPP), mesencefalo (MES), Caudato Putamen (CPU) e Nucleus Accumbens (NAC). L'analisi WB eseguita sulle proteine solubili estratte dalle diverse regioni isolate ha evidenziato come l'espressione di CLU sia ubiquitaria nelle regioni analizzate, seppure il livello di espressione vari, essendo più basso in MES e più elevato in IPP. In CPU e NAC l'espressione di CLU è lievemente inferiore rispetto ad IPP, ma sensibilmente più elevata rispetto a MES (Figura 4.25) CPU e NAC insieme costituiscono lo striato, la regione maggiormente colpita dalla neurodegenerazione nella MP.

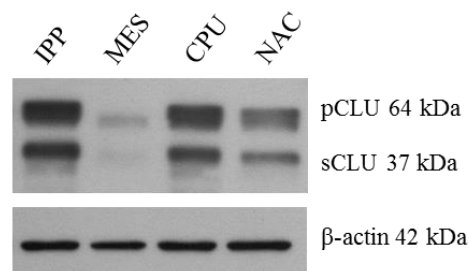


Figura 4.25: Analisi dei livelli della proteina CLU in diverse regioni del cervello di topi WT.

WB rappresentativo dei livelli di CLU in IPP, MES, CPU e NAC. La β -actina è stata usata come controllo del caricamento.

IPP = Ippocampo, MES= Mesencefalo, CPU = Caudato Putamen, NAC = Nucleus Accumbens, pCLU= forma pre-secreta di CLU, sCLU = forma matura di CLU pronta per la secrezione.

4.7 MESSA A PUNTO DEI TEMPI DI TRATTAMENTO CON ROTENONE

Il rotenone è un pesticida che causa l'inibizione del *complesso I* della catena di trasporto degli elettroni, con conseguente aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che producono stress ossidativo e degenerazione selettiva dei neuroni dopaminergici dello striato e della sostanza nigra¹⁴⁵. Rispetto alla somministrazione orale, l'infusione cerebrale o la somministrazione mediante iniezione stereotassica intracranica in topi riduce la tossicità generica del farmaco e causa una perdita progressiva e selettiva dei neuroni dopaminergici con conseguente comparsa di sintomi motori e comportamentali che mimano quelli della MP^{146,147}. Per individuare la durata del trattamento in grado di indurre degenerazione dopaminergica, è stato condotto un esperimento preliminare testando tre diversi tempi di esposizione al farmaco. 11 topi WT di entrambi i sessi e di 4 mesi di età hanno ricevuto un'iniezione unilaterale stereotassica di rotenone (1µg/µL) a livello del "medial forebrain bundle" e sono stati suddivisi nei seguenti tre gruppi sperimentali:

- Gruppo 5 dpi: costituito da 3 animali sacrificati dopo 5 giorni dall'iniezione;
- Gruppo 10 dpi: costituito da 4 animali sacrificati dopo 10 giorni dall'iniezione;
- Gruppo 15 dpi: costituito da 4 animali sacrificati dopo 15 giorni dall'iniezione.

Mediante l'analisi WB è stato misurato il livello di espressione della TH, enzima marker delle cellule dopaminergiche, in varie regioni del cervello (MES, NAC, CPU), sia dell'emisfero ipsilaterale che controlaterale. L'analisi è stata eseguita anche su IPP, una regione priva di cellule dopaminergiche che costituisce un buon controllo negativo dell'esperimento. L'espressione di TH in MES, NAC e CPU della regione ipsilaterale non varia rispetto alla stessa regione dell'emisfero controlaterale né dopo 5 né dopo 10 giorni dall'iniezione (*Figura 4.26 A e B*). Dopo 15 giorni, invece, è stata evidenziata una riduzione dell'espressione di TH a livello del lobo ipsilaterale in NAC e CPU rispetto al corrispettivo controlaterale. Non è stata riscontrata a questi tempi una rilevante alterazione di TH in MES (*Figura 4.26 C*).

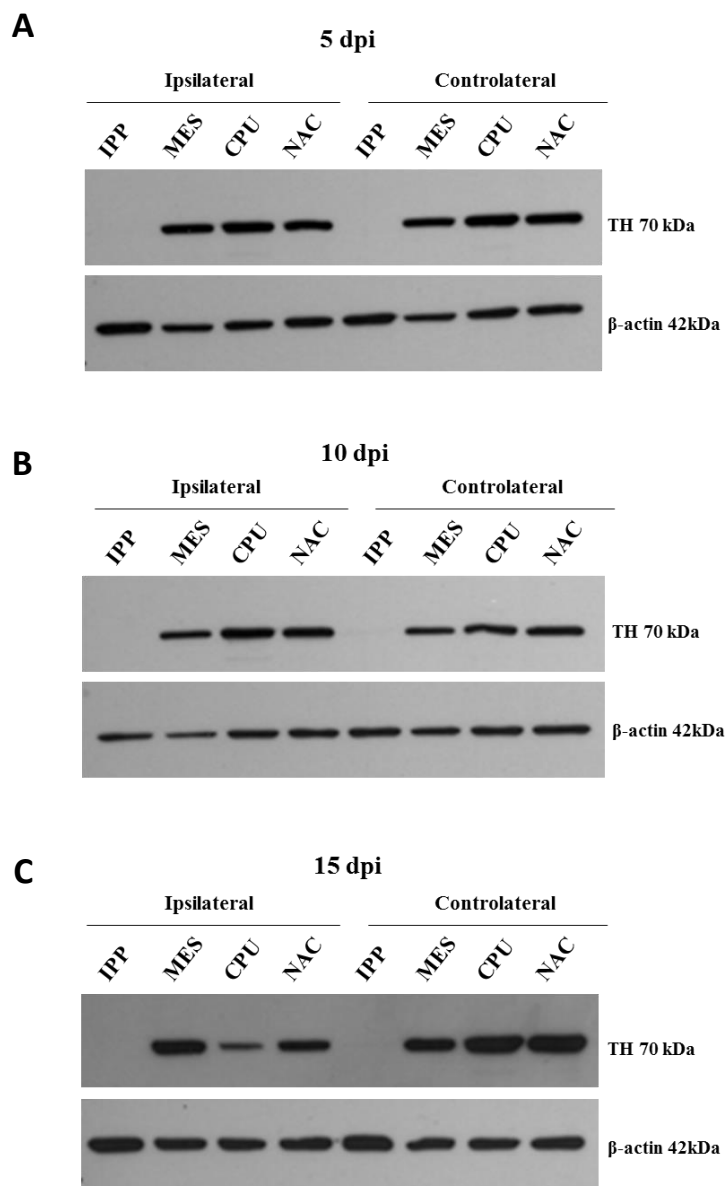


Figura 4.26: Analisi dei livelli di TH in topi WT che hanno ricevuto un'iniezione unilaterale stereotassica intracranica di rotenone.

WB rappresentativo dei livelli di TH in MES, CPU e NAC del lobo ipsilaterale e controlaterale dopo 5 giorni di trattamento (A), dopo 10 giorni di trattamento (B) e dopo 15 giorni di trattamento (C).

La β -actina è stata usata come controllo del caricamento. IPP = Ippocampo, MES = Mesencefalo, CPU = Caudato Putamen, NAC= Nucleus Accumbens.

4.8. EFFETTI DELL'ABROGAZIONE DI CLU SULLA NEURODEGENERAZIONE INDOTTA DA ROTENONE

Sulla base dei risultati ottenuti, che hanno indicato la presenza di neurodegenerazione dopaminergica dopo due settimane dall'iniezione di rotenone, è stato allestito un esperimento finalizzato a valutare gli effetti del knock-out di CLU sulla comparsa ed entità della neurodegenerazione (*Figura 4.27*).

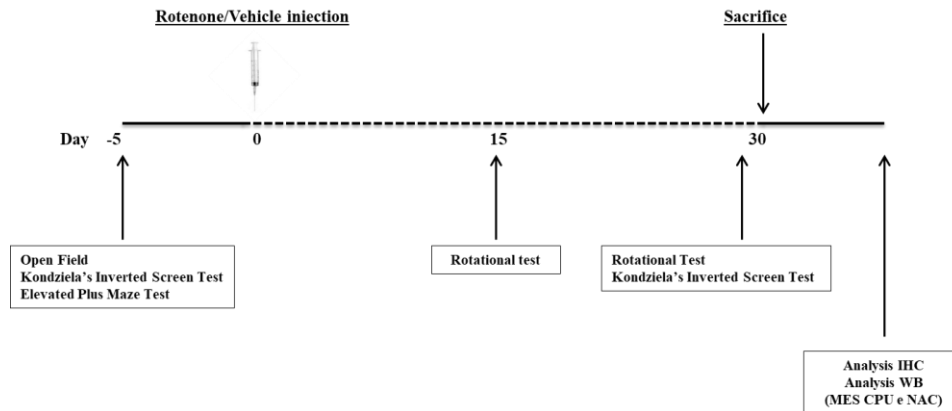


Figura 4.27: Timeline della sperimentazione animale.

Rappresentazione grafica della sequenza temporale relativa a tutte le procedure e analisi previste nel piano sperimentale.

A tale scopo, sono stati utilizzati 49 animali di età compresa tra i 9 e 12 mesi, di entrambi i sessi e aventi genotipo CLU-KO (n=33) e WT (n=16) (caratteristiche descritte nel Capitolo Materiali e Metodi). Tutti gli animali sono stati sottoposti ad una valutazione comportamentale preliminare, mediante test atti a stabilire se, di per sé, la perdita di espressione di CLU abbia effetti sulla forza muscolare (*Kondziela's Inverted Screen Test*), sul comportamento locomotorio e/o sull'attitudine all'esplorazione di un ambiente nuovo (*Open Field Test*, *Elevated Plus Maze Test*) degli animali CLU-KO rispetto ai fratelli WT.

L'*Open Field Test* (OF) ha evidenziato, una ridotta propensione degli animali testati all'esplorazione di un ambiente nuovo, che non differisce nei due gruppi sperimentali. Infatti sia gli animali WT che CLU-KO passano una minima parte (23,8% per i WT e 16,4% per i CLU-KO) del tempo totale di osservazione (10 min) al centro dell'arena, preferendo invece camminare lungo le pareti o stazionare negli angoli della stessa (*Figura 4.28 A*). Il dato è in linea con i valori medi di letteratura per il ceppo C57Bl/6. Similmente, anche i dati dell'*Elevated Plus Maze Test* (EPM) evidenziano una ridotta tendenza degli animali a trascorrere il tempo nelle braccia aperte, come atteso per animali del ceppo C57Bl/6, e non si rilevano differenze significative fra i due gruppi sperimentali (*Figura 4.28 B*). Il risultato del *Kondziela's Inverted Screen Test* (IST) evidenzia che la maggior parte degli animali testati

passa quasi tutto il tempo del test legato alla griglia, evidenziando una forza muscolare in linea con i dati di letteratura pubblicati per gli animali WT di questo ceppo. Sebbene per gli animali CLU-KO si misurino tempi di latenza alla caduta tendenzialmente inferiori rispetto ai WT, le differenze non sono statisticamente significative (*Figura 4.28 C*). I test eseguiti, nel complesso, indicano che l'animale CLU-KO, in assenza di altri stimoli stressogeni, non esibisce un fenotipo comportamentale alterato rispetto ai fratelli WT.

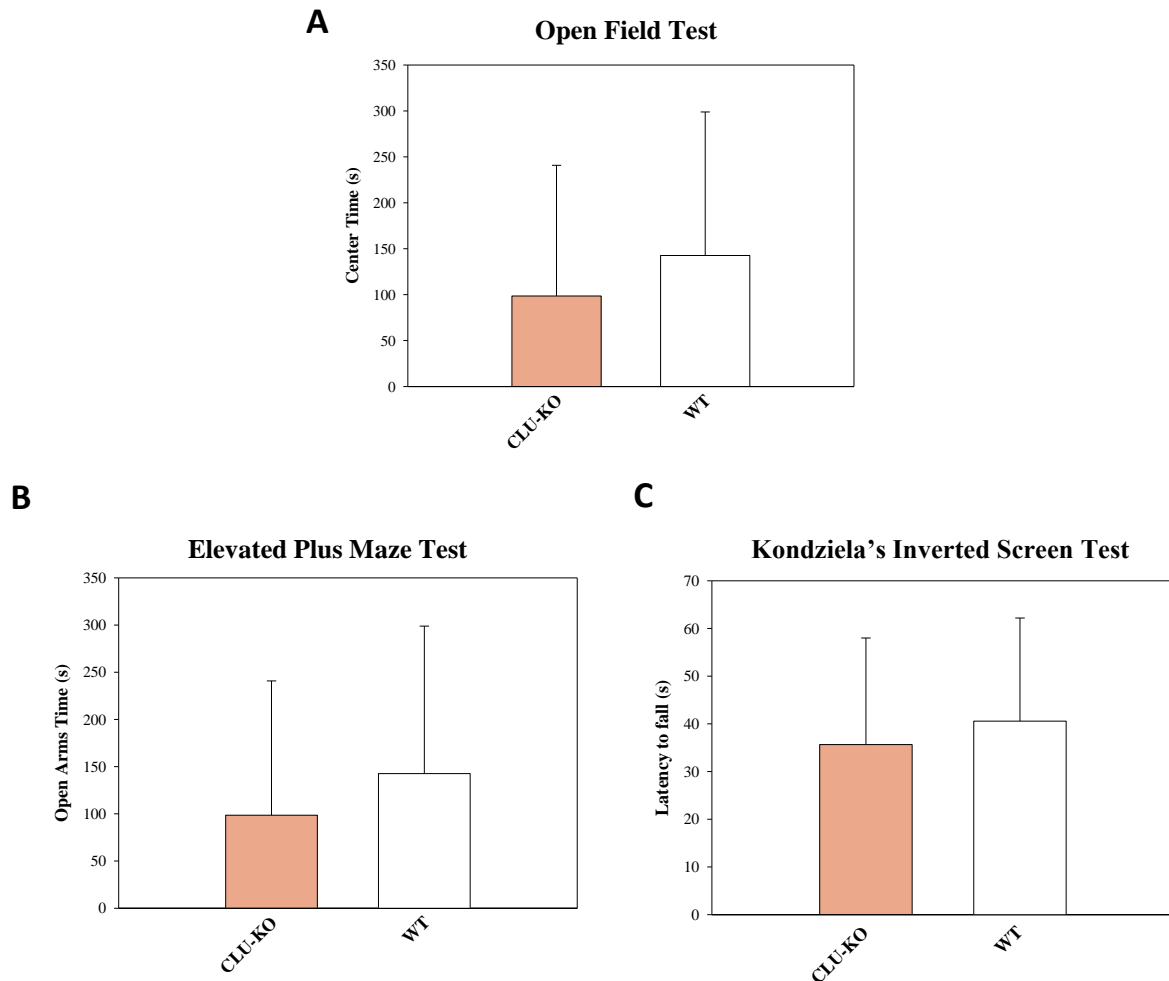


Figura 4.28: Risultati dei test comportamentali iniziali in topi CLU-KO e WT.

(A) Locomozione spontanea e capacità di esplorazione in un ambiente nuovo valutate mediante l'*Open Field Test* ed espresse in termini di tempo che l'animale passa nel centro dell'arena. (B) Capacità di esplorazione e grado di ansietà valutati mediante l'*Elevated Plus Maze Test* ed espressi in termini di tempo (s) che l'animale passa sulle braccia del supporto prive di protezione. (C) Forza muscolare valutata mediante il *Kondziela's Inverted Screen Test* ed espressa come tempo (s) di latenza alla caduta.

Per tutti i grafici, le barre d'errore rappresentano la DS relativa all'analisi di 33 animali per il gruppo CLU-KO e 16 animali per il gruppo WT (*Test t di Student, $p \geq 0,05$*).

Gli animali sono stati, quindi, suddivisi in 4 gruppi sperimentali, sulla base del genotipo (CLU-KO e WT) e del tipo di trattamento (rotenone o veicolo) cui venivano destinati, come specificato in *Tabella 4.1*.

	CLU-KO	WT
Rotenone	n= 13	n= 8
Vehicle	n= 10	n= 6

Tabella 4.1: Disegno fattoriale della sperimentazione e numerosità dei gruppi esaminati.

Dopo 15 giorni dall'iniezione gli animali sono stati sottoposti ad un test di lateralizzazione (*Rotational Test*) ed al test di valutazione della forza muscolare (IST). Poiché non sono state riscontrate evidenti alterazioni del comportamento locomotorio (dati non mostrati), il trattamento è stato protratto per altri 15 giorni e i test sono stati, quindi, ripetuti dopo 30 giorni dall'iniezione. Al termine delle misure comportamentali, una parte degli animali è stata sacrificata, il cervello è stato rapidamente prelevato, dissezionato e congelato per l'estrazione delle proteine e l'analisi WB della TH. La rimanente parte di animali è stata profondamente anestetizzata ed i cervelli sono stati perfusi e fissati per le analisi immunohistochimiche (IHC) della TH su sezione paraffinata (*Tabella 4.2*).

	WB		IHC	
	CLU-KO	WT	CLU-KO	WT
Rotenone	n= 4	n= 3	n= 9	n= 4
Vehicle	n= 4	n= 2	n= 6	n= 3

Tabella 4.2: Suddivisione degli animali dello studio in base alle procedure di prelievo del cervello per l'esecuzione di analisi biochimiche (WB) e istologiche (IHC).

Prima di analizzare i dati di comportamento si è proceduto a verificare l'entità della neurodegenerazione indotta da rotenone mediante analisi WB ed immunohistochimica. Nei cervelli degli animali destinati alle analisi WB, la perdita di neuroni dopaminergici è stata stimata, calcolando, mediante analisi densitometrica, il rapporto tra l'intensità delle bande della TH dalle regioni ipsilaterali (poste nell'emisfero cerebrale lesionato) e quella delle corrispondenti regioni controlaterali (poste nell'emisfero cerebrale non lesionato), ognuna normalizzata per l'intensità della β -actina (*Figura 4.29*). Valori inferiori ad 1 del rapporto indicano una riduzione dell'espressione della TH e sono indicativi di neurodegenerazione. L'analisi WB mostra come i valori più bassi dell'espressione di TH si registrano in CPU e NAC di animali WT e CLU-KO trattati con rotenone, senza differenze significative in base al genotipo (*Figura 4.29 B e C*). I risultati evidenziano anche una maggiore sensibilità al veicolo degli animali CLU-KO rispetto ai WT, infatti, mentre in questi ultimi il rapporto TH

(ipsilaterale)/ TH (controlaterale) è maggiore o uguale ad 1 nelle aree analizzate, nei primi risulta inferiore ad 1 in CPU e NAC (*Figura 4.29 A, B e C*).

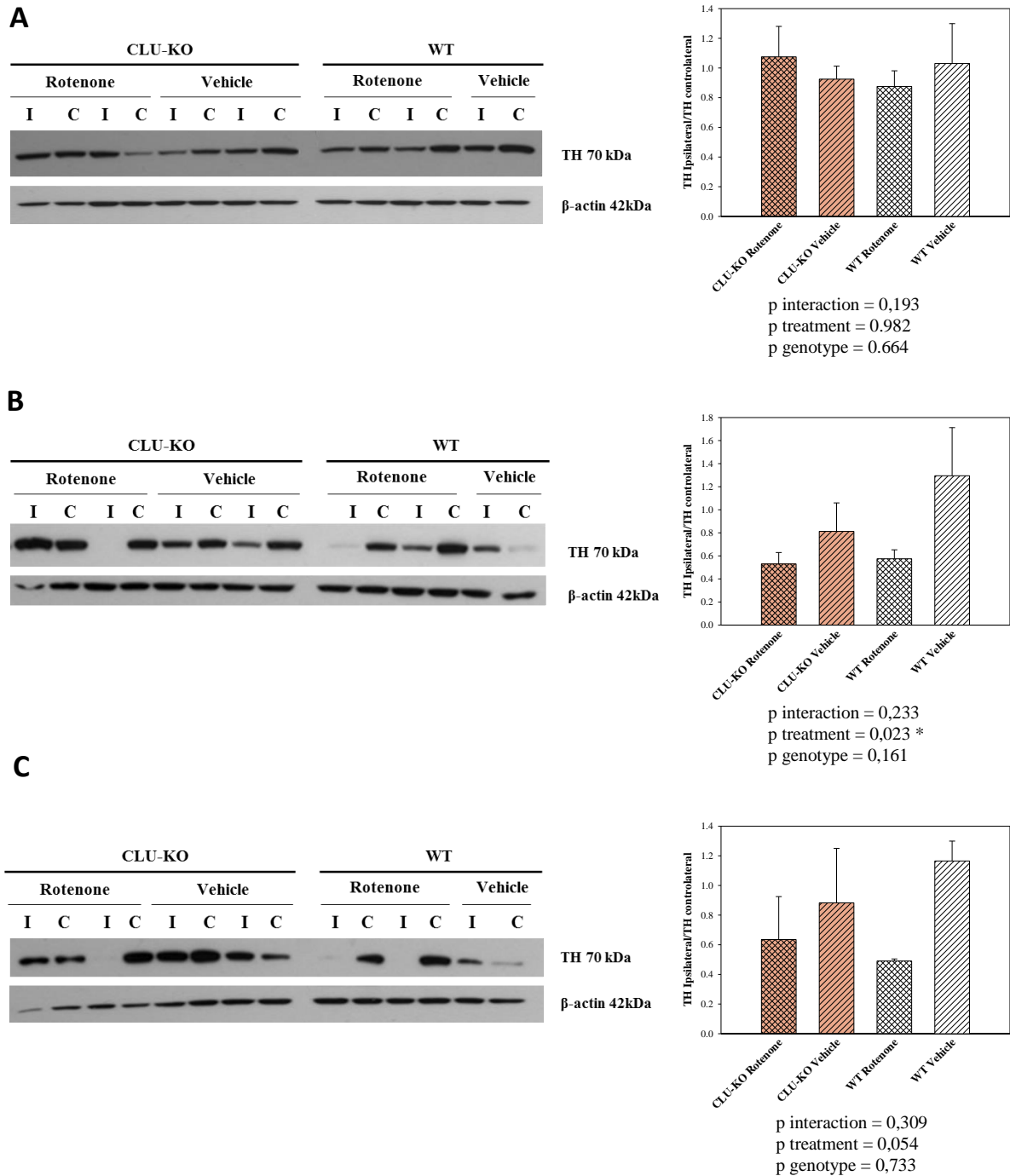


Figura 4.29: Analisi WB del livello di neurodegenerazione in topi CLU-KO e WT trattati con rotenone o soluzione veicolo.

WB rappresentativo e analisi densitometrica dei livelli di TH in MES (A), CPU (B) e NAC (C) espressa come rapporto tra intensità delle bande misurate nelle regioni ipsilaterali rispetto alle corrispettive controlaterali.

La β -actina è stata usata come controllo del caricamento. Per tutti i grafici, le barre d'errore rappresentano la DS relativa all'analisi di 4 animali per il gruppo CLU-KO Rotenone, 4 animali per il gruppo CLU-KO Vehicle, 3 animali per il gruppo WT Rotenone e 2 animali per il gruppo WT Vehicle (*Two way ANOVA*, * $p < 0,05$). MES = Mesencefalo, CPU = Caudate Putamen, NAC = Nucleus Accumbens.

La perdita di neuroni dopaminergici negli animali destinati all'analisi istologica è stata stimata calcolando il rapporto tra il numero delle singole cellule dopaminergiche TH positive del lobo ipsilaterale ed il numero di cellule dopaminergiche del corrispettivo lobo controlaterale.

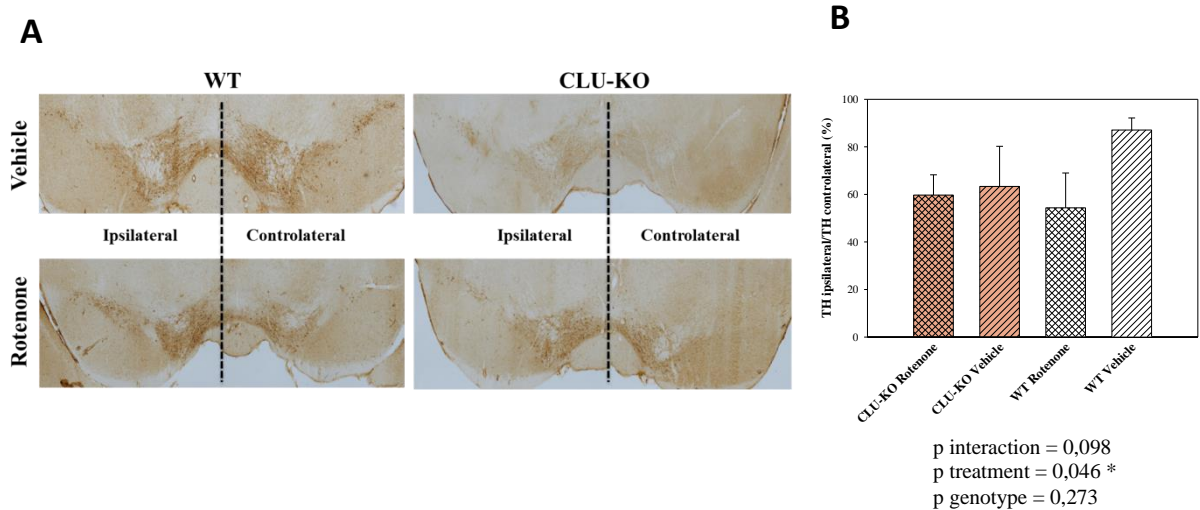


Figura 4.30: Analisi IHC del livello di neurodegenerazione in topi CLU-KO e WT trattati con rotenone o soluzione veicolo.

(A) Immagine rappresentativa dell'analisi IHC relativa all'espressione di TH. (B) Livello di TH nel mesencefalo espresso come rapporto in percentuale tra il numero delle singole cellule dopaminergiche TH positive del lobo ipsilaterale e il numero di cellule dopaminergiche del corrispettivo lobo controlaterale. Le barre d'errore rappresentano la DS relativa all'analisi di 9 animali per il gruppo CLU-KO Rotenone, 6 animali per il gruppo CLU-KO Vehicle, 4 animali per il gruppo WT Rotenone e 3 animali per il gruppo WT Vehicle (Two way ANOVA, * $p < 0,05$).

Similmente a quanto osservato con l'analisi WB, il trattamento con rotenone induce una perdita di cellule dopaminergiche paragonabile sia nei WT che nei CLU-KO (Figura 4.30 A e B) e che l'iniezione del veicolo produce una riduzione dei livelli di TH maggiore in animali CLU-KO che in quelli WT. Sulla base delle analisi molecolari, sono stati esclusi dall'analisi dei dati del comportamento gli animali trattati con rotenone per i quali il rapporto TH (ipsilaterale)/ TH (controlaterale) è risultato maggiore o uguale ad uno, indicativo della mancata induzione di neurodegenerazione e quelli per i quali l'osservazione istologica ha evidenziato un errore di posizione della traccia dell'iniezione.

Gli effetti della lesione unilaterale della regione nigro-striatale sono stati valutati mediante il test di rotazione asimmetrica indotto da apomorfina. I risultati evidenziano come gli animali CLU-KO che ricevono l'iniezione di rotenone, siano gli unici ad avere un aumento netto del numero di rotazioni controlaterali (56% delle rotazioni anti-clockwise), come atteso in seguito a degenerazione di neuroni situati nell'emisfero destro, sede dell'iniezione stereotassica (Figura 4.31 A). Il dato, seppure indichi una maggiore sensibilità degli animali CLU-KO alla

neurodegenerazione indotta da rotenone, non raggiunge la significatività statistica, né rispetto al gruppo CLU-KO veicolo né rispetto al gruppo WT rotenone. La valutazione dell'effetto della neurodegenerazione unilaterale sulla forza muscolare è stata eseguita confrontando, per ogni gruppo sperimentale, i dati dell'IST eseguito prima del trattamento (T_0) con quelli ottenuti dopo 30 giorni dall'iniezione (T_{30}). I dati mostrano una tendenza alla riduzione del tempo di latenza alla caduta degli animali del gruppo WT rotenone, rispetto a tutti gli altri gruppi. In ogni caso la differenza non è mai significativa nel confronto fra gruppi (Figura 4.31 B).

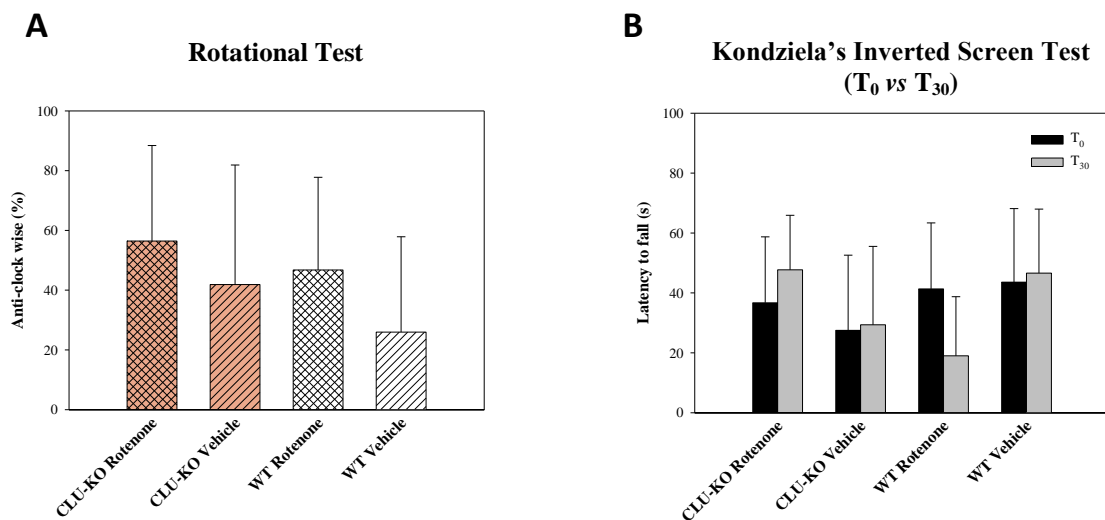


Figura 4.31: Test comportamentali post-trattamento in topi CLU-KO e WT.

(A) Lateralizzazione valutata mediante il *Rotational Test* ed espressa in numero di giri antiorari eseguiti dall'animale. Per tutti i grafici, le barre d'errore rappresentano la DS relativa all'analisi di 7 animali per il gruppo CLU-KO Rotenone, 8 animali per il gruppo CLU-KO Vehicle, 6 animali per il gruppo WT Rotenone e 5 animali per il gruppo WT Vehicle (*Two way ANOVA*, $p \geq 0,05$). (B) Forza muscolare valutata mediante il *Kondziela's Inverted Screen Test* ed espressa come tempo (s) di latenza alla caduta. Il grafico mostra il confronto tra il test eseguito prima del trattamento e dopo il trattamento per ogni gruppo sperimentale. Per le barre corrispondenti al T_0 , le barre d'errore rappresentano la DS relativa all'analisi di 13 animali per il gruppo CLU-KO Rotenone, 9 animali per il gruppo CLU-KO Vehicle, 8 animali per il gruppo WT Rotenone e 6 animali per il gruppo WT Vehicle. Per le barre corrispondenti al T_{30} , le barre d'errore rappresentano la DS relativa all'analisi di 7 animali per il gruppo CLU-KO Rotenone, 8 animali per il gruppo CLU-KO Vehicle, 6 animali per il gruppo WT Rotenone e 5 animali per il gruppo WT Vehicle. T_0 = analisi eseguita prima del trattamento; T_{30} = analisi eseguita dopo 30 giorni di trattamento (*Test t di Student T_0 vs T_{30}* , $p \geq 0,05$).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante molti progressi siano stati fatti nella comprensione di alcuni aspetti dell'eziopatogenesi della MP, rimane la necessità di individuare target molecolari per diagnosticare precocemente l'esordio della malattia, seguirne il comportamento clinico e definire nuove terapie.

Numerose evidenze sperimentali supportano l'ipotesi che la formazione di oligomeri e fibrille di α Syn svolga un ruolo cruciale nella patogenesi della MP, e più in generale delle LBD, poiché innesca un processo a cascata che porta alla formazione di caratteristiche inclusioni citoplasmatiche definite LB⁶¹. In questo contesto, gli chaperone molecolari, come le HSP, rivestono un ruolo cruciale per il mantenimento della proteostasi, in quanto costituiscono la prima linea di difesa della cellula contro la formazione di aggregati, assistendo in particolar modo al trasporto e alla degradazione di proteine *misfolded*, alla dissociazione di aggregati proteici ed al *refolding* di proteine denaturate⁷³. CLU, una glicoproteina extracellulare e altamente espressa nel sistema nervoso centrale, svolge un'attività simile a quella delle HSP ATP-indipendenti e sebbene sia destinata alla secrezione, in condizioni di elevato stress cellulare, si accumula all'interno della cellula dove assiste alla degradazione delle proteine *misfolded*^{106,110,113}. Molti studi hanno investigato il ruolo svolto da CLU nell'insorgenza e progressione di patologie neurodegenerative associate alla formazione di accumuli proteici tossici, e in particolare, la sua capacità di interferire con la formazione di depositi del β -amiloide nella MA¹⁰⁶. Lo scopo di questo progetto è stato quello di indagare il ruolo svolto da CLU nei meccanismi di difesa cellulare attivati per contrastare gli effetti del processo di aggregazione di α Syn in modelli *in vitro* ed *in vivo* di MP.

Il primo obiettivo è stato quello di indagare come varia l'espressione di CLU con il progredire della malattia in tessuti cerebrali di pazienti affetti da LBD a stadi precoci e tardivi (1-3 e 5-6 della scala di Braak). Dall'analisi eseguita a livello dello striato, regione maggiormente colpita da queste patologie, emerge come l'espressione di CLU aumenta significativamente rispetto al gruppo controllo sia nei casi allo stadio precoce che nei casi allo stadio tardivo. Il dato è in accordo con l'up-regolazione di CLU misurata nel fluido cerebrospinale di pazienti affetti da MP^{136,137}, ed è rilevante poiché mostra, per la prima volta, che CLU è up-regolata nello striato di pazienti affetti da LBD quando la malattia è ancora in uno stadio precoce, ovvero quando generalmente non sono presenti, o sono molto lievi i sintomi motori tipici degli stadi avanzati. L'espressione di CLU correla direttamente con quella di α Syn negli stadi precoci, ed inversamente ad essa negli stadi tardivi. Il dato, solo apparentemente contraddittorio, necessita di essere interpretato alla luce del fatto che con il progredire della

neurodegenerazione aumenta la formazione di aggregati insolubili di α Syn, come peraltro testimoniato dalla refertazione istologica. Pertanto, ciò che osserviamo nei lisati proteici dei tessuti è una riduzione della presenza delle forme solubili.

Sulla base di questi dati, che suggeriscono un possibile ruolo di CLU in risposta all'up-regolazione di α Syn già all'esordio della malattia, e tenendo in considerazione che la duplicazione e triplicazione del gene codificante α Syn si associano a forme gravi di MP ad esordio giovanile⁶²⁻⁶⁶, si è proceduto con la sperimentazione *in vitro* in cellule SH-SY5Y nelle quali α Syn è stata stabilmente espressa. La sovraespressione di α Syn non provoca di per sé cambiamenti importanti nella morfologia cellulare, fatta salva una maggiore eterogeneità delle cellule SH-Syn e SH-Mock rispetto alla linea parentale, compatibile con la procedura di trasfezione ed integrazione del plasmide e successiva selezione antibiotica. Le cellule SH-Syn proliferano meno di quelle SH-Mock e 144 ore dopo la semina la differenza risulta statisticamente significativa. In accordo con altri studi¹⁴⁸, i nostri dati evidenziano che la sola sovraespressione di α Syn, anche se sufficiente a ridurre la vitalità e portare all'attivazione dell'apoptosi, attraverso un aumento dell'attività delle caspasi effettrici 3/7¹⁴⁹, non è in grado di innescare il processo di formazione degli aggregati. Pertanto, per aggravare lo stress proteotossico, le cellule sono state trattate con MG132 (0,4 μ M, IC50), un inibitore del proteasoma. In queste condizioni ciò che si osserva è un cambio della distribuzione di α Syn nelle frazioni proteiche a solubilità differenziata che sono state analizzate. Solo in cellule SH-Syn_T sono state evidenziate forme oligomeriche, sia nella frazione solubile in 2% SDS, che rappresenta quanto è possibile solubilizzare dalla frazione insolubile in 1% Triton X-100, sia nei pellet insolubili in entrambi i buffer di lisi a forza detergente crescente. Tali oligomeri, caratterizzati da vario peso molecolare, provano l'avvenuto innesco del processo di aggregazione della proteina. Inoltre, la comparsa di α Syn nei mezzi di coltura delle sole cellule SH-Syn_T supporta l'ipotesi che, in condizioni di proteostasi gravemente compromessa, gli aggregati di questa proteina possano creare pori nella membrana cellulare attraverso i quali raggiungono il liquido cerebrospinale, favorendo la propagazione della neurodegenerazione a cellule limitrofe¹⁵⁰. In accordo con la letteratura¹⁵¹, la sovraespressione di α Syn è associata all'induzione trascrizionale di Bip, uno chaperone molecolare che assiste il corretto ripiegamento proteico a livello del RE, senza modificare l'espressione di ATF4, un fondamentale fattore trascrizionale attivato dalla via di PERK. Similmente, né CHOP, uno dei principali fattori di trascrizione pro-apoptotici attivati nell'UPR, né XBP1us, fattore di trascrizione che controlla l'espressione di geni coinvolti nel ripiegamento proteico, nella

secrezione e nell'ERAD, sono alterati a seguito dell'overespressione di α Syn. Poiché nell'UPR Bip agisce come sensore di proteine *misfolded*, l'aumento dell'espressione di questo chaperone in cellule SH-Syn è indicativo di una risposta adattativa della cellula per far fronte ad uno stadio iniziale della perturbazione della proteostasi, causato dalla sovraespressione di α Syn. L'analisi condotta dopo trattamento con MG132 mostra un'attivazione massiccia dell'UPR sia in cellule SH-Syn_T che SH-Mock_T, come testimoniato dall'incremento significativo di tutti i marcatori analizzati. È rilevante osservare che l'espressione di ATF4, CHOP e XBP1_{us} è significativamente più alta in SH-Syn_T rispetto ai controlli SH-Mock_T, indicando un contributo addizionale specifico dell'aggregazione di α Syn all'UPR generato a seguito del blocco del proteasoma. In accordo, l'attivazione dell'apoptosi è maggiore in SH-Syn_T rispetto ai controlli SH-Mock_T e supporta l'ipotesi che l'accumulo di aggregati insolubili di α Syn produca effetti citotossici.

Nel modello proposto è stata valutata l'espressione di CLU e delle HSP più studiate in merito alla MP. È stato osservato che la sola sovraespressione di α Syn determina un aumento dell'espressione di CLU. Inoltre, in condizioni di trattamento, quando è innescato il processo di aggregazione, la sua presenza risulta significativamente più alta nei pellet ottenuti dalle cellule SH-Syn_T rispetto a quelli delle cellule controllo SH-Mock_T. Per contro, la sola sovraespressione di α Syn non è in grado di innescare un aumento dei livelli di espressione di Hsp27 e Hsp70, sia in assenza che in presenza di MG132. Questi dati sottolineano che le Hsp27 e Hsp70 sono coinvolte nella risposta cellulare alla grave alterazione della proteostasi, in quanto la loro espressione è modificata in seguito al trattamento, ma in modo sostanzialmente indipendente e non correlato alla specifica condizione di sovraespressione ed aggregazione di α Syn. Per l'Hsp90, invece, si osserva in assenza di trattamento una redistribuzione della proteina fra le frazioni analizzate in cellule SH-Syn. L'Hsp90 sembra ridursi nella frazione intracellulare solubile in 1% Triton X-100 e contemporaneamente aumentare lievemente nella frazione solubile in 2% SDS. A seguito del trattamento con MG132, e quindi in presenza di aggregati di α Syn, il livello di Hsp90 non varia fra le frazioni di proteine estratte da SH-Syn_T rispetto a quelle delle cellule controllo SH-Mock_T, sebbene sia stato osservato un suo aumento a livello trascrizionale che suggerisce l'esistenza di meccanismi di regolazione post-trascrizionali e/o post-traduzionali. Nel modello cellulare studiato, quindi, è CLU lo chaperone, tra quelli analizzati, che in maniera più evidente e netta modifica la propria espressione, incrementandola, in risposta alla sovraespressione di α Syn, (lieve compromissione della proteostasi) e a seguito della formazione di aggregati conseguenti al blocco del proteasoma. A supporto della relazione fra α Syn e CLU e in

accordo con altri studi¹³⁵, è stata osservata una co-localizzazione fra queste due proteine all'interno della cellula, che risulta essere massima in prossimità della membrana cellulare delle cellule SH-Syn_T e che si presenta sotto forma di puntinature, suggestive della formazione di aggregati proteici insolubili. Tramite un esperimento di co-immunoprecipitazione, è stato dimostrato, inoltre, che la co-localizzazione tra le due proteine è dovuta ad un'effettiva interazione diretta. Questo dato suggerisce che CLU possa, essendo in grado di legare α Syn, interferire con il processo di aggregazione.

Coerentemente, la riduzione dei livelli di espressione di CLU, ottenuta mediante specifiche sequenze siRNA-CLU, non ha avuto effetti sulla trascrizione di α Syn ma ha favorito la formazione di aggregati ad alto peso molecolare anche in assenza di trattamento con MG132. Il silenziamento di CLU in cellule SH-Syn non si accompagna ad una variazione dell'espressione di Hsp27 e Hsp70 in nessuna delle condizioni testate, suggerendo che l'azione di CLU non può essere vicariata da un aumento compensativo delle altre proteine chaperone. Diversamente, il silenziamento di CLU si accompagna ad una riduzione dell'espressione dell'Hsp90 in cellule SH-Syn. I dati raccolti non ci permettono di definire se gli eventi sono semplicemente concomitanti o in qualche modo correlati, o addirittura legati da una relazione di causa-effetto e necessiteranno di ulteriori approfondimenti in sperimentazioni future. Quello che possiamo escludere è che le due proteine interagiscono direttamente fra loro nel modello sperimentale utilizzato, poiché i risultati della co-immunoprecipitazione (dati non mostrati) sono negativi.

Il silenziamento di CLU in cellule SH-Syn non ha avuto alcun effetto sull'espressione dei marker dello stress dell'RE in assenza di trattamento, mentre ha determinato un aumento significativo dell'espressione di Bip in cellule SH-Syn_{siRNA-T} rispetto alle cellule SH-Syn_{NC-T}. Questo dato, correla con gli effetti misurati sull'aggregazione di α Syn e rafforza l'idea che la riduzione dell'espressione di CLU faciliti il processo di aggregazione ed aggravi l'UPR in condizioni di blocco del proteasoma. Nonostante questi dati nel loro complesso suggeriscano un coinvolgimento specifico di CLU nella risposta cellulare adattativa alla sovraespressione di α Syn, l'abolizione della sua espressione non modifica significativamente né la vitalità cellulare né l'attivazione del pathway apoptotico, suggerendo che l'up-regolazione di CLU sia solo una delle strategie molecolari messe in campo dalla cellula per contrastare l'alterazione dell'equilibrio proteostatico.

Poiché gli studi *in vitro* di “*loss-of-function*” della proteina CLU sull'aggregazione di α Syn non possono rappresentare la complessità del sistema biologico *in vivo*, si è impiegato un

modello animale per valutare gli effetti dell'abrogazione dell'espressione di CLU sul processo neurodegenerativo. I modelli murini per lo studio della MP comprendono modelli transgenici e modelli farmacologici indotti dalla somministrazione di neurotossine. Nessun modello, fra quelli descritti in letteratura, è privo di limitazioni, ma si è preferito propendere per un modello farmacologico per semplificare il disegno sperimentale che doveva necessariamente prevedere l'uso di animali knock-out per CLU, evitando così la generazione di animali doppi transgenici attraverso l'incrocio di due ceppi a genotipo modificato. La scelta è pertanto caduta su un modello di MP indotto da somministrazione unilaterale intracranica di rotenone, che in varie specie di animali da esperimento si è dimostrato utile ad indurre la perdita progressiva di neuroni dopaminergici causando la comparsa di sintomi motori e comportamentali simili a quelli della malattia umana^{146,147}. Si è preferito l'uso del rotenone rispetto alla più ampiamente utilizzata 6-idrossi dopamina poiché questa neurotossina, pur inducendo nell'animale da esperimento il quadro patologico del danno neurodegenerativo tipico della MP, non è in grado di indurre né sovraespressione né aggregazione di α Syn, come invece riesce a riprodurre il rotenone¹⁴⁷.

L'analisi dei livelli di espressione di CLU in diverse regioni del cervello di topi WT del ceppo C57BL/6 ha mostrato, in accordo con la letteratura, come la presenza di questa proteina sia ubiquitaria nelle regioni analizzate, seppure il livello di espressione vari nelle diverse regioni. In particolare, CLU è meno espressa nel MES, mentre il suo livello risulta essere elevato in CPU e NAC, regioni che insieme costituiscono lo striato, una delle zone maggiormente colpite dalla neurodegenerazione nella MP.

Quindi sono stati eseguiti test comportamentali, al fine di stabilire se, di per sé, l'abrogazione dell'espressione di CLU nel background genetico C57Bl/6, topi CLUKO, comportasse alterazioni nella forza muscolare, sul comportamento locomotorio (IST) e/o sull'attitudine all'esplorazione di un ambiente nuovo (OF, EPM) rispetto ai WT. I test eseguiti non hanno evidenziato differenze comportamentali fra i due gruppi e hanno permesso di concludere che l'animale CLU-KO non esibisce un fenotipo comportamentale alterato in assenza di altri stimoli. Abbiamo quindi proseguito la sperimentazione, con la somministrazione stereotassica di rotenone o veicolo, in animali CLU-KO e WT ed abbiamo ripetuto la valutazione comportamentale a 30 giorni dall'iniezione, immediatamente prima del sacrificio. Mediante analisi WB ed IHC si è proceduto a verificare l'entità della neurodegenerazione indotta, valutando l'espressione della TH residua nel lobo ipsilaterale. Le analisi hanno evidenziato una notevole variabilità individuale nell'espressione di questo marcatore, sottolineando un certo grado di variabilità nella estensione della lesione unilaterale indotta dal rotenone, che

comunque ha raggiunto una entità media sempre inferiore al 50%, indipendentemente dal genotipo analizzato. Dall'analisi emerge, inoltre, che la somministrazione del solo veicolo è stata sufficiente a indurre nei soli animali CLU-KO, livelli di degenerazione dopaminergica paragonabili a quelli degli animali iniettati con rotenone. Questi risultati, da una parte evidenziano una maggiore sensibilità dell'animale CLU-KO all'iniezione stereotassica rispetto all'animale WT, ma dall'altra rendono impossibile evidenziare differenze ascrivibili al trattamento in questo gruppo rispetto al controllo non trattato. L'analisi dei test comportamentali eseguiti sui topi nei quali è stata evidenziata la presenza di neurodegenerazione non ha mostrato differenze significative fra i gruppi, seppure sia stato mostrato un aumento netto del numero di rotazioni controlaterali nei topi CLU-KO trattati con rotenone (*Rotational Test*), suggestivo di una maggiore sensibilità di questi animali alla lesione unilaterale. A posteriori possiamo affermare che i test scelti per la valutazione del comportamento non sono risultati adeguati ad evidenziare le piccole differenze comportamentali tra le diverse condizioni analizzate, anche considerata l'entità massima di neurodegenerazione che il rotenone è stato in grado di provocare. Questi test, infatti, riescono a evidenziare differenze comportamentali solo quando il livello di degenerazione è perlomeno del 60%, quindi superiore a quello raggiunto con la somministrazione di rotenone in questo lavoro. Sebbene sia stato innescato un processo neurodegenerativo, quindi, il livello di riduzione di cellule dopaminergiche non è stato sufficiente ad indurre differenze comportamentali valutabili mediante test di lateralizzazione o di forza. Inoltre, se alla limitata estensione di neurodegenerazione ottenuta con rotenone si aggiunge la ridotta riproducibilità della manovra di iniezione stereotassica e l'elevata suscettibilità dell'animale CLU-KO al veicolo utilizzato, si ottiene una situazione nella quale non è possibile evidenziare differenze significative ascrivibili al genotipo, al trattamento o all'interazione fra questi fattori sulla neurodegenerazione indotta e sul comportamento.

In conclusione, i dati ottenuti con questo lavoro hanno per la prima volta messo in luce un effettivo coinvolgimento di CLU nel processo di aggregazione di α Syn, sottolineando in particolare come la risposta di questo chaperone avvenga già in una fase precoce e spesso asintomatica della malattia (dati ottenuti *ex vivo*) e, coerentemente, già in risposta alla sola sovraespressione di α Syn quando gli aggregati non sono ancora evidenziabili (dati ottenuti *in vitro*). CLU, inoltre, è l'unico chaperone, tra quelli analizzati, a modificare nettamente la propria espressione, incrementandola, sia in condizioni di sola sovraespressione di α Syn, quando l'attivazione dell'UPR è ancora irrilevante, sia a seguito della formazione di aggregati

conseguenti al blocco del proteasoma. Per di più, poiché ad una riduzione dell'espressione di CLU è associato un aumento della formazione di aggregati di α Syn, è possibile concludere che CLU abbia un ruolo specifico nel controllo del *folding* e/o dell'aggregazione di α Syn, ruolo che è supportato da una effettiva interazione fisica fra le due proteine. Infine, tramite gli esperimenti di neurodegenerazione indotta da rotenone, seppur non siano state rilevate differenze comportamentali imputabili all'assenza di CLU, è stata evidenziata una certa sensibilità dell'animale CLU-KO alle procedure eseguite che supporta il concetto di una funzione cito-protettiva di CLU, in accordo con quanto osservato *in vitro*.

Tutto quanto sperimentalmente provato con questo lavoro di tesi fornisce il punto di partenza per validare, attraverso necessari ed ulteriori studi futuri, CLU come un potenziale target per lo sviluppo di strategie farmacologiche, in grado di rallentare/impedire la progressione della MP attraverso il controllo ed il ripristino dell'equilibrio proteostatico, la cui alterazione rappresenta un tratto precoce e comune delle malattie da *misfolding*.

Bibliografia

1. Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A. & Kelly, J. W. Adapting Proteostasis for Disease Intervention. **319**, 916–920 (2008).
2. Jahn, T. R. & Radford, S. E. The Yin and Yang of protein folding. **272**, 5962–5970 (2005).
3. Rajan, R. S., Illing, M. E., Bence, N. F. & Kopito, R. R. Specificity in intracellular protein aggregation and inclusion body formation. **2001**, (2001).
4. Kurtishi, A., Rosen, B., Patil, K. S., Alves, G. W. & Møller, S. G. Cellular Proteostasis in Neurodegeneration. 3676–3689 (2019).
5. Yerbury, J. J., Stewart, E. M., Wyatt, A. R. & Wilson, M. R. Quality control of protein folding in extracellular space. (2005). doi:10.1038/sj.embor.7400586
6. Tóth, M. E., Gombos, I. & Sántha, M. Heat shock proteins and their role in human diseases. (2015).
7. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-hartl, M. & Hartl, F. U. *Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis*. (2013). doi:10.1146/annurev-biochem-060208-092442
8. Kampinga, H. H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. 105–111 (2009). doi:10.1007/s12192-008-0068-7
9. Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A. & Hartl, F. U. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. **25**, 2519–2528 (2006).
10. Ballinger, C. A. *et al.* Identification of CHIP , a Novel Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein That Interacts with Heat Shock Proteins and Negatively Regulates Chaperone Functions. **19**, 4535–4545 (1999).
11. Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F. & Voellmy, R. Repression of Heat Shock Transcription Factor HSF1 Activation by HSP90 (HSP90 Complex) that Forms a Stress-Sensitive Complex with HSF1. **94**, 471–480 (1998).
12. Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T. & Frydman, J. Cellular Strategies of Protein Quality Control. 1–14 (2011).
13. Labbadia, J. & Morimoto, R. I. HHS Public Access. 435–464 (2015). doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033955.The
14. Coux, O. & Goldberg, A. L. STRUCTURE AND FUNCTIONS OF THE 20s AND 26s PROTEASOMES. (1996).
15. Díaz-villanueva, J. F., Díaz-molina, R. & García-gonzález, V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. 17193–17230 (2015). doi:10.3390/ijms160817193
16. Finley, D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. (2009). doi:10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607
17. Dick, T. P. *et al.* Contribution of Proteasomal β_1 -Subunits to the Cleavage of Peptide Substrates Analyzed with Yeast Mutants *. **273**, 25637–25646 (1998).

18. Goldberg, A. L. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. **199**, 583–588 (2012).
19. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 365–381 (2018).
20. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. **221**, 3–12 (2010).
21. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Mammalian autophagy : core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 124–131 (2010).
22. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An Overview of Autophagy : **20**, 460–473 (2014).
23. Tekirdag, K., Cuervo, A. M. & Avenue, P. JBC Papers in Press . Published on December 15 , 2017 as Manuscript R117 . 818237 The latest version is at <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R117.818237>. (2017). doi:10.1074/jbc.R117.818237
24. Meijer, A. J. & Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **36**, 2445–2462 (2004).
25. Wolff, S., Weissman, J. S. & Dillin, A. Review Differential Scales of Protein Quality Control. *Cell* **157**, 52–64 (2014).
26. Bukau, B., Gloge, F. & Becker, A. H. ScienceDirect Co-translational mechanisms of protein maturation. 24–33 (2014). doi:10.1016/j.sbi.2013.11.004
27. Duttler, S., Pechmann, S. & Frydman, J. Article Principles of Cotranslational Ubiquitination and Quality Control at the Ribosome. *Mol. Cell* **50**, 379–393 (2013).
28. Wang, F., Durfee, L. A. & Huijbrechtse, J. M. Article A Cotranslational Ubiquitination Pathway for Quality Control of Misfolded Proteins. *Mol. Cell* **50**, 368–378 (2013).
29. Anckar, J. & Sistonen, L. Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response : Implications in Aging and Disease. (2011). doi:10.1146/annurev-biochem-060809-095203
30. Gomez-pastor, R., Burchfiel, E. T. & Thiele, D. J. Regulation of heat shock transcription. *Nat. Publ. Gr.* **19**, 4–19 (2017).
31. Morimoto, R. I. & Gabriella Santoro, M. Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.* **16**, 833–838 (1998).
32. Nadeau, K., Das, A. & Walsh, C. T. Hsp90 Chaperonins Possess ATPase Activity and Bind Heat Shock Transcription Factors and Peptidyl Prolyl Isomerases *. **268**, 1479–1487 (1993).
33. Boyault, C. *et al.* HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. 2172–2181 (2007). doi:10.1101/gad.436407.HDAC6
34. Morimoto, R. I. Dynamic Remodeling of Transcription Complexes by Molecular Chaperones. **110**, 281–284 (2002).

35. Rao, R. V & Bredesen, D. E. Misfolded proteins , endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. 653–662 (2004). doi:10.1016/j.ceb.2004.09.012
36. Gonzalez-teuber, V. *et al.* Small Molecules to Improve ER Proteostasis in Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 684–695
37. Smith, H. L. & Mallucci, G. R. The unfolded protein response : mechanisms and therapy of neurodegeneration. 2113–2121 (2016). doi:10.1093/brain/aww101
38. Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. **10**, 3787–3799 (1999).
39. Brodsky, J. L. Perspective Cleaning Up : ER-Associated Degradation to the Rescue. *Cell* **151**, 1163–1167 (2012).
40. Ogen-shtern, N., Ben, T. & Lederkremer, G. Z. Protein aggregation and ER stress. *Brain Res.* **1648**, 658–666 (2016).
41. Leitman, J., Hartl, F. U. & Lederkremer, G. Z. rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. 1–10 (2013). doi:10.1038/ncomms3753
42. Credle, J. J. *et al.* Neurobiology of Disease α -Synuclein-mediated inhibition of ATF6 processing into COPII vesicles disrupts UPR signaling in Parkinson ’ s disease. *Neurobiol. Dis.* **76**, 112–125 (2015).
43. Colla, E. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Is Important for the Manifestations of α -Synucleinopathy In Vivo. **32**, 3306–3320 (2012).
44. Lajoie, P. & Snapp, E. L. Formation and Toxicity of Soluble Polyglutamine Oligomers in Living Cells. **5**, (2010).
45. Khanam, H., Ali, A. & Asif, M. European Journal of Medicinal Chemistry Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches : A review *. *Eur. J. Med. Chem.* **124**, 1121–1141 (2016).
46. Wirdefeldt, K. *et al.* Epidemiology and etiology of Parkinson’s disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* **26**, 1–58 (2011).
47. Spillantini, M. G. *et al.* Alpha-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
48. Poewe, W. *et al.* Parkinson disease. (2017). doi:10.1038/nrdp.2017.13
49. Dorsey, E. R. *et al.* The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. **8**, 3–8 (2018).
50. Storstein, O. T. A. Epidemiology of Parkinson ’ s disease Diagnosis of PD. *J. Neural Transm.* **124**, 901–905 (2017).
51. Hatano. Department of Neurology, Juntendo University, School of Medicine, Hongo Bunkyo Tokyo, Japan. 1075–1093 (2009). doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06403.x
52. Campenhausen, S. Von *et al.* Prevalence and incidence of Parkinson ’ s disease in Europe B. **15**, 473–490 (2005).
53. Rey, N. L. Del *et al.* Advances in Parkinson ’ s Disease : 200 Years Later. **12**, 1–14

- (2018).
54. Chaudhuri, K. R., Healy, D. G. & Schapira, A. H. V. Non-motor symptoms of Parkinson ' s disease : diagnosis and management. **5**, (2006).
 55. Poewe, W. & Mahlknecht, P. The clinical progression of Parkinson ' s disease. *Park. Realt. Disord.* **15**, S28–S32 (2009).
 56. Goetz, C. G. *et al.* Movement Disorder Society Task Force Report on the Hoehn and Yahr Staging Scale : Status and Recommendations. **19**, 1020–1028 (2004).
 57. Goetz, C. G. *et al.* Movement Disorder Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson ' s Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale Presentation and Clinimetric Testing Results. **23**, 2129–2170 (2008).
 58. Goldenberg, M. M. & Mar, M. Medical Management of Parkinson ' s Disease. **33**, (2008).
 59. Brooks, D. J. Optimizing levodopa therapy for Parkinson ' s disease with levodopa / carbidopa / entacapone : implications from a clinical and patient perspective. 39–47 (2008).
 60. Guttman, M., Kish, S. J. & Furukawa, Y. Current concepts in the diagnosis and management of Parkinson ' s disease. (2003).
 61. Burre, J., Sharma, M. & Su, T. C. Cell Biology and Pathophysiology of a -Synuclein. (2018).
 62. Hollmann, M. *et al.* Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson ' s Disease. **276**, 2045–2048 (1997).
 63. Kruger. © 1998 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturegenetics>. (1998).
 64. Zarranz, J. J. *et al.* The New Mutation , E46K , of α -Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia. 164–173 (2003).
 65. Singleton, A. B. *et al.* α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson ' s Disease. **302**, (2003).
 66. Farrer, M. *et al.* Comparison of Kindreds with Parkinsonism and α -Synuclein Genomic Multiplications. 174–179 (2004).
 67. Silva, B., Breydo, L., Silva, B. A., Breydo, L. & Uversky, V. N. Targeting the Chameleon : a Focused Look at α -Synuclein and Its Roles in Neurodegeneration Targeting the Chameleon : a Focused Look at α -Synuclein and Its Roles in Neurodegeneration. (2012). doi:10.1007/s12035-012-8334-1
 68. Uversky, V. N. *et al.* Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate. **277**, 11970–11978 (2002).
 69. States, L., Eliezer, D., Kutluay, E., Jr, R. B. & Browne, G. Conformational Properties of a -Synuclein in its Free. (2001). doi:10.1006/jmbi.2001.4538

70. Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A. & Lansbury, P. T. NACP , A Protein Implicated in Alzheimer ' s Disease and Learning , Is Natively. **35**, (1996).
71. Fauvet, B. *et al.* α -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes , Mammalian Cells , and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer * □. **287**, 15345–15364 (2012).
72. Dettmer, U. *et al.* In Vivo Cross-linking Reveals Principally Oligomeric Forms of α - Synuclein and β -Synuclein in Neurons and Non-neural. **288**, 6371–6385 (2013).
73. Cox, D., Carver, J. A. & Ecroyd, H. Preventing α -synuclein aggregation: The role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (2014). doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.024
74. Narhi, L. *et al.* Both Familial Parkinson ' s Disease Mutations Accelerate α - Synuclein Aggregation *. **274**, 9843–9846 (1999).
75. Rochet, J., Conway, K. A. & Lansbury, P. T. Inhibition of Fibrillization and Accumulation of Prefibrillar Oligomers in Mixtures of Human and Mouse R - Synuclein †. 10619–10626 (2000). doi:10.1021/bi001315u
76. Ding, T. T., Lee, S., Rochet, J. & Lansbury, P. T. Annular R -Synuclein Protofibrils Are Produced When Spherical Protofibrils Are Incubated in Solution or Bound to Brain-Derived Membranes †. 10209–10217 (2002). doi:10.1021/bi020139h
77. Fredenburg, R. A. *et al.* The Impact of the E46K Mutation on the Properties of R - Synuclein in Its Monomeric and Oligomeric States †. 7107–7118 (2007). doi:10.1021/bi7000246
78. Greenbaum, E. A. *et al.* The E46K Mutation in α -Synuclein Increases Amyloid Fibril Formation *. **280**, 7800–7807 (2005).
79. Uversky, V. N. Neuropathology , biochemistry , and biophysics of a -synuclein aggregation. 17–37 (2007). doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04764.x
80. Yonetani, M. *et al.* Conversion of Wild-type α -Synuclein into Mutant-type Fibrils and Its Propagation in the Presence of A30P Mutant * □. **284**, 7940–7950 (2009).
81. Giehm, L., Svergun, D. I., Otzen, D. E. & Vestergaard, B. Low-resolution structure of a vesicle disrupting α -synuclein oligomer that accumulates during fibrillation. **108**, (2011).
82. Apetri, M. M., Maiti, N. C., Zagorski, M. G., Carey, P. R. & Anderson, V. E. Secondary Structure of a -Synuclein Oligomers : Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy. 63–71 (2006). doi:10.1016/j.jmb.2005.10.071
83. Kanazawa, T., Uchihara, T., Takahashi, A., Nakamura, A. & Orimo, S. Three-Layered Structure Shared Between Lewy Bodies and Lewy Neurites — Three-Dimensional Reconstruction of Triple-Labeled Sections. **18**, 415–422 (2008).
84. Bruinsma, I. B. *et al.* Inhibition of a -synuclein aggregation by small heat shock proteins. 2956–2967 (2011). doi:10.1002/prot.23152
85. Shtilerman, M. D., Ding, T. T. & Lansbury, P. T. Accelerated Publications Molecular

- Crowding Accelerates Fibrillization of α -Synuclein : Could an Increase in the Cytoplasmic Protein Concentration Induce Parkinson ' s Disease ? †. **1**, 3855–3860 (2002).
86. Munishkina, L. A., Cooper, E. M., Uversky, V. N. & Fink, A. L. The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation y. 456–464 (2004).
 87. Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M. & Masliah, E. α -Synuclein Inhibits β -Synuclein Aggregation : A Possible Role as an Anti-Parkinsonian Factor. **32**, 213–223 (2001).
 88. Winner, B. *et al.* In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. (2011). doi:10.1073/pnas.1100976108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1100976108
 89. Xue, W. *et al.* Fibril Fragmentation Enhances Amyloid Cytotoxicity * □. **284**, 34272–34282 (2009).
 90. Tyedmers, J., Mogk, A. & Bukau, B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 22–24 (2010).
 91. Gertz, H., Siegers, A. & Kuchinke, J. Stability of cell size and nucleolar size in Lewy body containing neurons of substantia nigra in Parkinson ' s disease. **637**, 339–341 (1994).
 92. Volles, M. J. & Lansbury, P. T. Zeroing in on the Pathogenic Form of α -Synuclein and Its Mechanism of Neurotoxicity in Parkinson ' s Disease †. **42**, (2003).
 93. Furukawa, K. *et al.* Plasma membrane ion permeability induced by mutant α -synuclein contributes to the degeneration of neural cells. 1071–1077 (2006). doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03803.x
 94. Chu, Y. *et al.* Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson ' s disease. 2058–2073 (2012). doi:10.1093/brain/aws133
 95. Smith, W. W. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant α -synuclein-induced toxicity. **14**, 3801–3811 (2005).
 96. Marques, O. & Outeiro, T. F. α -Synuclein : from secretion to dysfunction and death. *Cell Death Dis.* **3**, e350-7 (2012).
 97. McLean, P. J. *et al.* TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: suppression of α -synuclein aggregation. *J Neurochem* **83**, 846–854 (2002).
 98. Kampinga, H. H. *et al.* Heat shock proteins as potential targets for protective strategies in neurodegeneration. *Lancet Neurol.* **15**, 748–759 (2016).
 99. Maiti, P., Manna, J. & Dunbar, G. L. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson ' s disease : Targets for potential treatments. 1–35 (2017). doi:10.1186/s40035-017-0099-z
 100. Friesen, E. L., Snoo, M. L. De, Rajendran, L., Kalia, L. V & Kalia, S. K. Chaperone-

- Based Therapies for Disease Modification in Parkinson ' s Disease. **2017**, (2017).
101. Andreasen, N., Fredman, P. & Blennow, K. Clusterin in cerebrospinal fluid : Analysis of carbohydrates and quantification of native and glycosylated forms. **48**, 718–728 (2006).
 102. Wyatt, A., Yerbury, J., Poon, S., Dabbs, R. & Wilson, M. *The Chaperone Action of Clusterin and Its Putative Role in Quality Control of Extracellular Protein Folding. Clusterin* **104**, (Elsevier Inc., 2009).
 103. Wilson, M. R. & Zoubeidi, A. Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* **21**, 201–213 (2017).
 104. Rizzi, F. & Bettuzzi, S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. 1–17 (2010). doi:10.1677/ERC-09-0140
 105. Bonacini, M. *et al.* Biochimica et Biophysica Acta Distinct promoters , subjected to epigenetic regulation , drive the expression of two clusterin mRNAs in prostate cancer cells. *BBA - Gene Regul. Mech.* **1849**, 44–54 (2015).
 106. Foster, E. M., Dangla-valls, A., Lovestone, S., Ribe, E. M. & Buckley, N. J. Clusterin in Alzheimer ' s Disease : Mechanisms , Genetics , and Lessons From Other Pathologies. **13**, 1–27 (2019).
 107. Kirszbaum, L. *et al.* Molecular cloning and characterization of the novel , human complement-associated protein , SP-40 , 40 : a link between the complement and reproductive systems. **8**, 711–718 (1989).
 108. Prochnow, H., Gollan, R., Rohne, P., Hassemer, M. & Koch-brandt, C. Non-Secreted Clusterin Isoforms Are Translated in Rare Amounts from Distinct Human mRNA Variants and Do Not Affect Bax-Mediated Apoptosis or the NF-κB Signaling Pathway. **8**, 1–15 (2013).
 109. Lakins, J. *et al.* Clusterin Biogenesis Is Altered during Apoptosis in the Regressing Rat Ventral Prostate *. **273**, 27887–27895 (1998).
 110. Rohne, P., Prochnow, H. & Koch-Brandt, C. The CLU-files: Disentanglement of a mystery. *Biomol. Concepts* **7**, 1–15 (2016).
 111. Reddy, K. B., Jin, G., Karode, M. C., Harmony, J. A. K. & Howe, P. H. Transforming Growth Factor (TGF) -Induced Nuclear Localization of Apolipoprotein J / Clusterin in Epithelial Cells †. **2960**, 6157–6163 (1996).
 112. Nizard, P. *et al.* Stress-Induced Retrotranslocation of Clusterin / ApoJ into the Cytosol. 554–565 (2007). doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x
 113. Gregory, J. M. *et al.* Clusterin protects neurons against intracellular proteotoxicity. 1–16 (2017). doi:10.1186/s40478-017-0481-1
 114. McCluskey, R. T., Frangionet, B. & Ghisot, J. Glycoprotein 330 / megalin : Probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid 13 at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. **93**, 4229–4234 (1996).

115. Kang, S. *et al.* Clusterin interacts with SCLIP (SCG10-like protein) and promotes neurite outgrowth of PC12 cells. **309**, 305–315 (2005).
116. Sansanwal, P., Li, L. & Sarwal, M. M. Inhibition of Intracellular Clusterin Attenuates Cell Death in Nephropathic Cystinosis. 612–625 (2015).
doi:10.1681/ASN.2013060577
117. Bailey, R. W., Dunker, A. K., Brown, C. J., Garner, E. C. & Griswold, M. D. Clusterin , a Binding Protein with a Molten Globule-like Region †. 11828–11840 (2001).
doi:10.1021/bi010135x
118. Viard, I. *et al.* Clusterin Gene Expression Mediates Resistance to Apoptotic. 290–296 (1999). doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00531.x
119. Loison, F. *et al.* Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress : implication of HSF1 – HSF2 heterocomplexes. **231**, 223–231 (2006).
120. Poon, S., Treweek, T. M., Á, M. R. W. Y., Easterbrook-smith, S. B. & Á, J. A. C. Y. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their α -folding pathway. **513**, (2006).
121. Poon, S., Easterbrook-smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A. & Wilson, M. R. Clusterin Is an ATP - Independent Chaperone with Very Broad Substrate Specificity that Stabilizes Stressed Proteins in a Folding-Competent State †. 15953–15960 (2006).
doi:10.1021/bi002189x
122. Clusterin, C. *et al.* Effects of Glycosylation on the Structure and Function of the Extracellular. 1412–1422 (2007). doi:10.1021/bi062082v
123. Carver, J. A., Rekas, A., Thorn, D. C. & Wilson, M. R. Review Article Small Heat-shock Proteins and Clusterin : Intra- and Extracellular Molecular Chaperones with a Common Mechanism of Action and Function ? **55**, 661–668 (2003).
124. Narayan, P. *et al.* The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid- β 1 – 40 peptide. **19**, 79–84 (2012).
125. Yerbury, J. J. *et al.* The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. doi:10.1096/fj.06-7986com
126. Yerbury, J. J. *et al.* The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. (2019). doi:10.1096/fj.06-7986com
127. Chen, Y. L. S. & Chen, L. L. J. Genetic polymorphisms of clusterin gene are associated with a decreased risk of Alzheimer ' s disease. 73–75 (2012). doi:10.1007/s10654-012-9650-5
128. Bettens, K. *et al.* Reduced secreted clusterin as a mechanism for Alzheimer-associated CLU mutations. *Mol. Neurodegener.* 1–12 (2015). doi:10.1186/s13024-015-0024-9
129. Rodríguez, M. F. B. P. A. & Ferrer, B. T. R. B. I. Clusterin solubility and aggregation in Creutzfeldt-Jakob disease. 295–301 (2004). doi:10.1007/s00401-004-0891-6
130. Mchattie, S., Wells, G. A. H., Bee, J. & Edington, N. Clusterin in Bovine Spongiform

- Encephalopathy (BSE). **121**, 159–171 (1999).
131. Xu, F., Karnaukhova, E. & Vostal, J. G. Biochimica et Biophysica Acta Human cellular prion protein interacts directly with clusterin protein ☆. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1782**, 615–620 (2008).
 132. Sasaki, K., Doh-ura, K., Wakisaka, Y. & Iwaki, T. Clusterin/apolipoprotein J is associated with cortical Lewy bodies: immunohistochemical study in cases with alpha-synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* **104**, 225–230 (2002).
 133. Lamoureux, F. *et al.* Clusterin Inhibition Using OGX-011 Synergistically Enhances Hsp90 Inhibitor Activity by Suppressing the Heat Shock Response in Castrate-Resistant Prostate Cancer. **71**, 5838–5850 (2011).
 134. Doh-ura, K. S. K., Ironside, J. W. & Iwaki, T. Increased clusterin (apolipoprotein J) expression in human and mouse brains infected with transmissible spongiform encephalopathies. 199–208 (2002). doi:10.1007/s004010100456
 135. Zhou, Y. *et al.* Analysis of α -Synuclein-associated Proteins by Quantitative Proteomics * □. **279**, 39155–39164 (2004).
 136. Maarouf, C. L. *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers of neuropathologically diagnosed Parkinson's disease subjects. *Neurol Res. Neurol Res* **34**, 669–676 (2012).
 137. Vranová, H. P. *et al.* CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **117**, 1177–1181 (2010).
 138. Prikrylova Vranova, H. *et al.* Clusterin CSF levels in differential diagnosis of neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* **361**, 117–121 (2016).
 139. Gao, J., Huang, X., Park, Y., Hollenbeck, A. & Chen, H. An Exploratory Study on CLU , CR1 and PICALM and Parkinson Disease. **6**, 4–8 (2011).
 140. Narayan, P., Meehan, S., Carver, J. A., Wilson, M. R. & Christopher, M. Europe PMC Funders Group Amyloid- β oligomers are sequestered by both intracellular and extracellular chaperones. **51**, 9270–9276 (2016).
 141. Bell, R. D. *et al.* Transport pathways for clearance of human Alzheimer ' s amyloid b - peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. 909–918 (2007). doi:10.1038/sj.jcbfm.9600419
 142. Deming, Y. *et al.* Neurobiology of Aging A potential endophenotype for Alzheimer ' s disease : cerebrospinal fluid clusterin. *Neurobiol. Aging* **37**, 208.e1-208.e9 (2016).
 143. Mclaughlin, L. *et al.* Apolipoprotein J / clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis Find the latest version : Apolipoprotein J / clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. **106**, 1105–1113 (2000).
 144. Krishna, A. *et al.* Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. *BMC Genomics* **15**, 1–21 (2014).
 145. Wallace, K. B. & Starkov, A. A. Mitochondrial Targets of Drug Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 353–388 (2000).

146. Weetman, J. *et al.* Increased SUMO-1 expression in the unilateral rotenone-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **544**, 119–124 (2013).
147. Carriere, C. H., Kang, N. H. & Niles, L. P. Experimental and Toxicologic Pathology Bilateral upregulation of a -synuclein expression in the mouse substantia nigra by intracranial rotenone treatment. *Exp. Toxicol. Pathol.* **69**, 109–114 (2017).
148. Falkenburger. Cellula models of Parkinson disease. **139**, 121–130 (2016).
149. Vekrellis. Inducible over-expression of wild type alpha-synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. 1348–1362 (2009). doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06054.x
150. Brundin, P., Melki, R. & Kopito, R. diseases. **11**, 301–307 (2010).
151. Bellucci. Induction of the unfolded protein response by α -synuclein in experimental models of Parkinson's disease. 588–605 (2011). doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07143.x