



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA IN
NEUROBIOLOGIA

Sede amministrativa: Università di Catania
Sedi Consorziate: Università di Roma “Sapienza” e di Pavia

XXII CICLO

ISTITUTO NEUROLOGICO MEDITERRANEO
IRCCS NEUROMED

SARA OROBELLO

**“Analysis of peripheral tissues and cell lines from patients
with Huntington's disease for searching biomarkers”**

**“Studio dei meccanismi patogenetici attraverso l'analisi di
tessuti periferici e linee cellulari nella malattia di Huntington
per la ricerca di nuovi biomarkers”**

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore: **Prof. ROBERTO AVOLA**

Tutor: **Prof. ROBERTO AVOLA**

Co-tutor: **Dott. FERDINANDO SQUITIERI (IRCCS NEUROMED)**

Candidata: **SARA OROBELLO**

Anno Accademico 2009-2010

<u>INTRODUCTION</u>	<u>4</u>
HUNTINGTON’S DISEASE: WHY BIOMARKERS ARE IMPORTANT	4
CLINICAL FEATURES	5
NEUROPATHOLOGY AND EXCITOTOXIC MECHANISMS	6
BIOMARKERS IN HD	8
HD SUBJECTS DATA BANK AT NEUROMED	9
CELL AND ANIMAL MODELS AVAILABLE AT NEUROMED	10
<u>RATIONALE</u>	<u>12</u>
<u>AIM</u>	<u>16</u>
<u>METHODS</u>	<u>17</u>
HD SUBJECTS	17
TRANSGENIC R6/2 AND YAC128 MICE	18
MEASUREMENTS OF TGF- B1 LEVELS IN SERUM AND SUPERNATANTS	18
MEASUREMENTS OF TGF-B1 LEVELS IN MICE	19
IMMUNOCYTOCHEMISTRY FOR TGF- B1 IN HUMAN AND MOUSE BRAIN SAMPLES	20
IN VITRO EXPERIMENTS	21
STRIATAL KNOCK-IN CULTURES	21
HUMAN FETAL GLIAL CELLS SVG-P12	22
TGF-B1 TREATMENTS AND CELL VIABILITY TEST	22
CELL TRANSFECTIONS	22
REAL-TIME RT-PCR ANALYSIS	23
STATISTICAL ANALYSIS	23
<u>RESULTS</u>	<u>24</u>
TGF-B1 SERUM LEVELS IN HD SUBJECTS AND HEALTHY CONTROLS	24
TGF-B1 EXPRESSION IN THE HD BRAIN	24

TGF- β 1 EXPRESSION IN R6 / 2 AND YAC128 MOUSE MODEL	25
REDUCED EXPRESSION OF TGF- β 1 IN MURINE ASTROCYTES	25
REDUCED EXPRESSION OF TGF- β 1 IN HUMAN GLIAL CELLS	26
REDUCED EXPRESSION OF TGF- β 1 IN STRIATAL-DERIVED KNOCK-IN CELLS	26
REDUCED EXPRESSION OF GLUT-1 AND GLUT-3 IN NEURONS AND GLIAL CELLS	27
TGF- β 1 STIMULATES GLUCOSE UPTAKE AND PROTECTS NEURONS	27
<u>DISCUSSION</u>	<u>28</u>
<u>ITALIAN VERSION</u>	<u>33</u>
<u>TABLES, FIGURES AND LEGENDS</u>	<u>62</u>
<u>REFERENCES</u>	<u>73</u>

Introduction

Huntington's Disease: why biomarkers are important

Huntington's disease (HD) is the most common and well-studied polyglutamine neurodegenerative disorder. It has a prevalence of 3–10 affected subjects per 100000 individuals in Western Countries (Rawlins 2010; Spinney 2010).

The disorder was first clinically described as a familial neuropsychiatric disease in the 19th century by George Huntington, but the responsible gene and its mutation were identified in 1993 (Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Since then, the knowledge on clinical and molecular aspects of the disease has been increasing exponentially. HD is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by the expansion of an unstable CAG triplet repeat beyond 36 in the HTT gene (Kremer et al. 1994), which codes for a large and ubiquitously expressed protein named huntingtin (htt).

The mutation length influences the age at onset and the disease progression, the expansion homozygosity causing a particularly more severe disease course and neuropathology (Squitieri et al., 2003). Although, most of cases show an age at onset around 40s, the disease may start early in the life or very late in the elderly according to the penetrance of the mutation (Rubinsztein et al., 1996). This leaves the pathology unpredictable in at risk individuals who undergo a predictive genetic test and discovery to be mutation carriers, the number of CAG repeats accounting for only 60-70% of the age at onset variation. Other factors of biological and/or environmental origin including gene modifiers contribute therefore to the beginning and development of the disease (Squitieri et al., 2000a; Wexler et al., 2004). Only when the mutation is particularly expanded and toxic, the disease starts in children even very early in life with a devastating course (Quarrel et al. 2009).

Therefore the age at onset unpredictability of most HD cases and the progression variability among patients strongly advises to search for markers sensitive enough to monitor the development of the pathological process in absence of symptoms in unaffected at risk subjects. Similarly, markers to test the progression of the disease other than the symptom changes would be crucial for monitoring the efficacy of further, yet unavailable, therapies, in symptomatic patients. Good biomarkers should be easy to get from mutation carrier subjects and must reflect a pathogenic mechanism of the disease.

So far, no validate markers have been described and introduced into the clinical practice.

Clinical features

HD symptoms include motor abnormalities, behavioural changes and progressive cognitive decline. Although the clinical landmark of the disease is chorea, an non finalistic involuntary movement similar to an uncontrolled dance of the whole body, many other symptoms characterize the disease course including dystonia, parkinsonism, gait disturbance, clumsiness, arm incoordination and ocular motor impairment (Penney et al., 1990; Di Maio et al., 1993). In about 7-8% cases the disease starts and progresses with atypical presentations characterized by impaired voluntary movements or involuntary movements other than chorea (Squitieri et al., 2000b). Very likely, the wide spectrum of symptoms depends on HD neuropathology extended to cortical brain areas, out of striatum, this last being the most and first affected brain structure (Rosas et al., 2008).

The majority of patients suffer also of muscle wasting and weight loss, despite constant caloric intake (Sanberg et al., 1981; Kirkwood et al., 2001; Djousse et al., 2002). Although the cause of these peripheral symptoms is still unclear, growing evidences indicate these alterations due to the direct effect of mutant htt on peripheral tissues (van der Burg et al., 2009). Recent study demonstrated the existence of a positive correlation between the levels of branched chain amino acids (valine, leucine and isoleucine), weight loss and disease progression in HD patients, reinforcing the importance of a systemic metabolic defect in HD pathology (Mochel et al., 2007). A number of endocrine abnormalities have also been reported in HD patients, including increased levels of corticosteroids (Heuser et al., 1991; Leblhuber et al., 1995; Bjorkqvist et al., 2006) and reduced levels of testosterone (Markianos et al., 2005). Peripheral deficits include also changes in neurotrophins levels (Ciammola et al., 2007); aberrant amplification of A(2A) receptor binding sites in blood (Varani et al., 2003; Maglione et al., 2005, 2006), changes in pro-catabolic serum profiling and plasma metabolites (Underwood et al., 2006; Mochel et al., 2007; Forrest et al., 2009), up-regulation of immune proteins (Dalrymple et al., 2007; Bjorkqvist et al., 2008; Forrest et al., 2009); and neuroendocrine disturbance (Saleh et al., 2009).

Muscles are also early affected in HD (Lodi et al., 2000; Ciammola et al., 2006), type 1 red fibre loss contributing to the weight loss (Charturvedi et al., 2009). Therefore, HD is

a systemic more than simply a brain pathology and this demonstration additionally induces to focus on the search markers of the disease also in periphery.

Neuropathology and excitotoxic mechanisms

The pathological hallmark of HD is the progressive atrophy of the striatum (caudate nucleus, pallidum and putamen), due to the spiny gabaergic neuron death. Indeed the most commonly used grading system to assess the severity of HD degeneration (developed by Vonsattel et al., 1985) is based on the pattern of striatal degeneration in post-mortem tissue; it classifies HD cases into five different severity grades (0–4), with a Grade 0 indistinguishable from normal brains. Interestingly, the degree of striatal atrophy also correlates with the degeneration of other non-striatal brain structures: intracellular dysfunction induced by mutant huntingtin progressively leads to the degeneration of important neuronal pathways and cell loss in the striatum, but also in cerebral cortex and other brain regions (Vonsattel & DiFiglia 1998; Kremer et al., 1990, 1991; Sapp et al., 2001; Kassubek et al., 2004; Petersén et al., 2005).

Various mechanisms such as excitotoxicity, metabolic impairment, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, apoptosis, abnormal production and transport of neurotrophic factors and autophagy have been implicated in HD pathology (Beal et al., 1986; Ross 2004; van der Burg et al., 2009). Many of these mechanisms, including astrogliosis, may slowly develop becoming increasingly pronounced by the late stages of the disease. In particular microglia activation reflects a progressive process of neuroinflammation, started during the asymptomatic stage of HD and increased overtime with the severity of the pathology (Sapp et al., 2001; Pavese et al., 2006; Tay et al., 2007).

Interestingly activated astrocytes and microglia can critically regulate processes of neuronal death and survival by secreting glutamate, neurotrophic factors, and pro- and anti-inflammatory cytokines (Shin et al., 2005). The capacity of the glial cells to remove extracellular glutamate from the synaptic cleft can also contribute to the vulnerability of striatal neurons to excitotoxicity. It was reported that mutant htt accumulates in the nucleus of glial cells in HD brains, decreasing the expression of the glutamate transporter. Moreover, while wild-type glial cells protect neurons against mutant htt-mediated neurotoxicity, glial cells expressing mutant htt do increase mutant htt-induced neuronal vulnerability, suggesting that a decrease in glutamate uptake by glial cells may indeed exacerbate neuronal excitotoxicity in HD (Shin et al., 2005). Such decrease in

glutamate uptake can be detected before any other evidence of neurodegeneration, suggesting that a defect in astrocytic glutamate uptake is an early event in HD (Liévens et al., 2001).

In conclusion an imbalance between neurotoxic and neuroprotective factors may ultimately be responsible for neuronal dysfunction and cell death.

Biomarkers in HD

One of the main aims of research in HD is to predict age at onset in mutation carriers and progression and drug efficacy in symptomatic patients (Squitieri et al., 2009). Without such advances in clinical research, no preventive neuroprotective therapy could be achieved (Squitieri and Ciarmiello 2010). Such important goal will strictly depend on the discovery of validated biomarkers. The identification of many potential markers in (dry biomarkers) and out (wet biomarkers) of brain does not however allow the translation in the clinical practice due to the variability of the results and the impossibility to follow up the marker in the single subject (Esmaeilzadeh et al., 2010). A biomarker should reflect a HD mechanism and HD neuropathology and should be validated in subjects with HD mutation. The right strategy would be to combine a specific set of different wet (from biological fluids) and dry (brain related) biomarkers together. They should then be related to clinical parameters.

In the case of wet biomarkers, different strategies can concur to disclose a biological change with the potentiality of a marker including a proper clinical stratification of large HD subject populations, sample collection from different peripheral tissues, replication and confirmation of the results to relate with central mechanisms. For instance, a large series of animal and cell models are now available (Mangiarini et al., 1996; Slow et al., 2003; Van Raamsdonk et al., 2005a Trettel et al.,2000)

HD Subjects data bank at Neuromed

We have been collecting clinical and genetic data on HD-patients and their families at the Neurogenetics Unit, IRCCS Neuromed of Pozzilli (IS), Italy. Data on approximately 1000 subjects mutation carriers are included in the bank, together with a large number of DNA, serum and other tissues. Patients are currently seen in the outpatient service at Neuromed. The age at onset is established considering motor and psychiatric manifestations using the Unified Huntington Disease Rating Scale (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996) and Mini-Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975) for motor, cognitive, behaviour, independence and progression rate assessment. The database includes all personal data, genetic family history and clinical details concerning age at onset, disease progression rate, disease duration etc. We also included in the database information regarding at risk subjects, indeed at Neuromed since 1998 it was established a predictive testing program according to the international ethical guidelines (Cannella et al., 2001).

Cell and Animal models available at Neuromed

Human HD cell lines. Together with a DNA Data Bank we established a Cellular Data Bank: different type of cell lines are obtained from patients after a specific informed consent for research valid for blood withdraw or tissue biopsy and obviously after the formal approval by the Bioethical Committee.

Actually we have the opportunity to study different peripheral cells such as: lymphoblastoid cells (120 lines), obtained by immortalization with Epstein-Barr Virus (EBV); primary myoblasts (20 lines) and fibroblasts (20 lines), obtained from biopsies of muscle and skin. All these cell lines are obtained from subjects with heterozygous and homozygous mutation at different CAG length and controls.

Human fetal glial cells SVG-p12: SVG-p12 cells are human fetal glial cell line obtained from ATCC Company. These cells are immortalized with SV40 and express replication competent SV40 large T antigen. We have the possibility to transfect them with a DNA construct containing 72 CAG triplets repeat (mutated length) and with a construct containing 25 CAG (normal length), in attempt to study phenotypical, structural and molecular changes.

Striatal knock-in cells. Striatal knock-in cells, stably expressing full-length huntingtin STHdhQ7/Q7, (ST7/7Q, wild-type cells) or full-length mutated huntingtin STHdhQ111/Q111 (ST111/111Q, mhtt cells) established from HdhQ111 knock-in mice (Trettel et al., 2000). HdhQ111 is a knock-in model based on a chimeric human/mouse exon 1 construct (Wheeler et al., 2000; 2002).

This cell lines have particularly useful tools for examining the molecular mechanisms of HD pathogenesis. The ST111/11 Q cell line expresses mutant huntingtin at endogenous levels, as the striatum is the most affected region in HD, the striatal origin of this cell model makes it optimal also to study glucose metabolism since energetic deficit and dysregulation have been well described in mutated lines ST111/111Q (Milakovic and Johnson 2005; Seong et al. 2005).

Transgenic R6/2 mice: they express Exon 1 of the human htt gene with 150 CAG repeats; the transgene expression in those mice is driven by the human huntingtin promoter (Mangiarini et al., 1996). The phenotypes of R6/2 transgenic mice mimic several symptoms and signs of the disease (Li et al., 2005). They exhibit neurological and endocrine changes resembling some symptoms seen in humans including choreic-like movements, tremors, epilepsy etc. R6/2 mouse develops symptoms rapidly and

huntingtin aggregates/inclusions formation first appear in the striatum and the cortex around 3-4 weeks of age (Meade et al., 2002). In R6/2 mice, the initial signs of motor symptoms appears after the 4th weeks of age, before that period they are considered a asymptomatic model, typically, they are severely impaired by 8–12 weeks of age, showing muscle atrophy around 8 weeks of age (Sathasivam et al., 1999) and they die at around 12-14 weeks of age.

YAC128 mice: YAC128 is a widely used yeast artificial chromosome full length (128CAG) human mutant HD transgenic model generated and characterized by the Hayden laboratory (Slow et al., 2003; Van Raamsdonk et al., 2005a). YAC128 mice exhibit motor abnormalities as early as 3 months with increased abnormalities at 6 months. Behavioral deficits are progressive and by 12 months is diminished significantly in comparison with controls. Modest striatal atrophy is found at 9 months with both striatal and cortical atrophy at 12 months (10–15% and 7–8% decreases in volume, respectively). Abnormally high nuclear htt immunoreactivity is present within striatal and other neurons from 2 months onwards. The disease onset appears at 3th months of age.

Razionale

As already mentioned, a defective production and/or activity of neurotrophic factors has been implicated in the pathophysiology of HD. Mutated huntingtin loses the ability to increase brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene transcription (Zuccato et al., 2001, 2003) and to enhance intracellular trafficking of BDNF (Gauthier et al., 2004; Del Toro et al., 2006). In addition, strategies that increase brain levels of BDNF or of glial-derived neurotrophic factor (GDNF), are neuroprotective in HD models (Bemelmans et al., 1999; Perez-Navarro et al., 1999; Duan et al., 2003; Kells et al., 2004; McBride et al., 2003, 2006; Pineda et al., 2007; DeMarch et al., 2008; Gharami et al., 2008; Squitieri et al., 2008; Erbert et al., 2010). The study of neurotrophic factors in HD can be extended to the peripheral blood in an attempt to obtain accessible indicators of disease progression and drug efficacy. For example, in HD subjects, serum BDNF levels are lower than in age-matched controls, the reduction correlates with the length of CAG repeats, and duration and severity of HD (Ciammola et al., 2007) since the presymptomatic life stage (Squitieri et al., 2009), and may be restored by potentially neuroprotective drugs (Squitieri et al., 2008, 2009). Thus, the reduction of BDNF levels in peripheral blood may reflect the reduced cortico-striatal production of BDNF associated with HD (Ferrer et al., 2000; Zuccato et al., 2005, 2008). Both BDNF and GDNF need transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) to actively work in the central nervous system.

We have therefore TGF- β 1 whose neuroprotective effects were presumed in the pathophysiology of chronic neurodegenerative disorders (Bruno et al., 1998; Kriegstein et al., 1998), and demonstrated in Alzheimer disease (AD) another chronic neurodegenerative pathology (Tesseur et al., 2006; Ueberham et al., 2006).

Transforming growth factor- β (TGF- β) has numerous cell and tissue functions including cell cycle control, regulation of early development, differentiation, extracellular matrix formation, hematopoiesis, angiogenesis, chemotaxis, and immune functions (Dennler et al., 2002). Particularly, TGF- β 1 is involved in neurodegenerative diseases and ischemic injury. TGF- β 1 expression is correlated with increased activated microglia and increased PrP protein deposition (Boche et al., 2006). In addition, TGF- β 1 decreases the

activation of caspase-3 and the mRNA expression of various kinds of inflammatory molecules (Kim et al., 2004).

The main sources of TGF- β 1 in the injured brain are astrocytes and microglia (Finch et al., 1993), although neurones produce it as well (Flanders et al., 1998). TGF- β 1 contributes to maintain neuronal integrity and survival of CNS neurons and to regulate microglial activation (Brionne et al., 2003). Accordingly, an altered expression of type-II TGF- β 1 receptor has been demonstrated in the brain of patients affected with Alzheimer's disease (AD) (Tesseur et al., 2006; Ueberham et al., 2006), and a reduced TGF- β 1 signaling increases amyloid deposition and neurodegeneration in transgenic AD mice (Tesseur and Wyss-Coray 2006).

The role of TGF- β 1 has been also studied in several other neurodegenerative diseases such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) (Ilzecka et al., 2002), Parkinson (PD) and Prion diseases (Boche et al., 2006), but never in HD where no data have been produced so far.

Moreover the group II of metabotropic glutamate receptors (mGlu2/3), which are expressed in astrocytes, are able to control the production of neurotrophic agents such as nerve growth factor (NGF) and TGF- β 1, suggesting that the activation of glial mGlu2/3 receptors promotes a novel form of glial-neuronal interaction mediated by the synthesis and release of such putative neuroprotective factors.

However, the mRNA expression of mGlu2/3 receptors is substantially reduced in the striatum of transgenic R6/2 mice, which express Exon 1 of human HD gene with an expanded CAG repeat (Cha et al., 1998). Moreover, reduced TGF- β 1 levels increases susceptibility to excitotoxic injury and neurodegeneration in heterozygous knockout mice for TGF- β 1 gene, whilst the overproduction of TGF- β 1 prevents degeneration after excitotoxic injury (Brionne et al., 2003). In addition, TGF- β 1 deficiency in transgenic mice enhances neuronal susceptibility to toxic insults (Brionne et al., 2003). TGF- β 1 production is under the control of extracellular signals, which include estrogens and excitatory amino acids acting at mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors (Bruno et al., 1998; Sortino et al., 2004) and the activation of glial mGlu2/3 receptors is neuroprotective via a paracrine mechanism mediated by TGF- β 1 (Bruno et al., 1998; D'Onofrio et al., 2001; Corti et al., 2007). Finally, TGF- β 1 is required for the neuroprotective activity of GDNF (Shober et al., 2007) and BDNF (Sometani et al., 2001; Lu et al., 2005).

Finally, TGF- β 1 indirectly influences the energetic metabolism whose defect does represent an important step of HD pathogenesis, through the interaction with the transportation of glucose (Kitagawa et al., 1991; Masumi et al., 1993; Inoki et al., 1999). Glucose hypometabolism is widely demonstrated in HD (Esmailzadeh et al., 2010). Indeed, fluoro desoxy glucose (FDG) positron emission tomography (PET) scan performed on the striatum of HD subjects showed impaired glucose metabolism since the presymptomatic life stages of HD (Esmailzadeh et al. 2010). Respiratory complexes II, III, and IV defects in postmortem HD brains associated with neuronal loss corroborate the hypothesis of remarkable energetic impairment in HD (Mann et al., 1990; Gu et al., 1996; Browne et al., 1997).

Whether a reduced brain glucose uptake is due to defective glycolysis (Powers et al., 2007), to the impaired glucose transportation (Gamberino and Brennan 1994) or both, has not been fully elucidated so far.

Whereas the first hypothesis concerning a defective glycolysis has been well documented and confirmed in different models of HD (Milakovic and Johnson 2005; Seong et al., 2005), little is known about the role of the glucose transportation in HD.

Delivery of glucose from the blood to the brain requires transport across the endothelial cells of the blood-brain barrier and into the neurons and glia. The facilitative glucose transporter proteins mediate these processes. The primary isoforms in brain are GLUT1, detected at high concentrations as a highly glycosylated form, (55 kDa) in blood-brain barrier, and also as a less glycosylated, 45 kDa form, present in parenchyma, predominantly glia; GLUT3 in neurons; and GLUT5 in microglia. The rest of the transporter family, GLUTs 2, 4, and 7, have also been detected in brain but at lower levels of expression and confined to more discrete regions. All of the transporters probably contribute to cerebral glucose utilization, as part of overall metabolism and metabolic interactions among cells (for review see Vannucci et al., 1997; Spector 2009). In HD a deficiency of glucose transporters GLUT-1 and 3 in post-mortem HD brain samples (I-II grade) from caudate was reported in only one study of several years ago (Gamberino and Brennan 1994). Interestingly, TGF- β 1 may improve glucose uptake and glycolysis in fibroblast and mesangial cells by enhancing GLUT-1 mRNA expression (Kitagawa et al., 1991; Masumi et al., 1993; Inoki et al., 1999).

Should TGF- β 1 be defective in HD, we could therefore hypothesize that the defective glucose transportation within the Central Nervous System in HD in both neurons and glial cells could be restored by increasing TGF- β 1 levels, enhancing GLUT-1

expression and ameliorating the glucose metabolism impairment occurred in HD pathogenesis.

Aim

We aimed to demonstrate that a TGF- β 1 deficiency could represent a novel mechanism contributing to HD pathogenesis and that such deficiency could highlight novel possible biomarkers of HD.

Our study will investigate the role of TGF- β 1 and of metabotropic glutamate (mGlu) receptors in neurodegeneration/neuroprotection mechanisms by using cellular and experimental animal models of HD and human blood and brain samples from HD subjects and control subjects. We will test whether TGF- β 1 is involved in the pathological mechanisms of HD.

Therefore first of all we will detect:

1. the levels of circulating serum TGF- β 1 obtained from an enlarged population of human subjects at different stages of the disease including asymptomatics and symptomatics compared with age matched controls.
2. the expression levels of TGF- β 1 in HD subjects' brain samples stratified according to several brain regions (from asymptomatic to advanced HD) compared with normal controls and patients affected with different neurological pathologies where the cytokine is potentially implied.

We will study the neuroprotection activity of TGF- β 1, analysing its collaborative role with glutamate receptors (mGlu2/3) using several *in vivo* and *in vitro* models:

- (i) transgenic mouse models as R6/2 and YAC128 (brain and periphery);
- (ii) striatal neuronal cell lines obtained from knock-in mice (Hdh CAG111)
- (iii) astroglial cell cultures obtained from mice and human glial cell line (SVG-p12) transiently transfected with exon-1-Htt-25Q-EGFP which express 25 CAG triplets and exon-1-Htt-72Q-EGFP which express 72 CAG triplets.

We will also analyse the relationship between glucose transport and TGF- β 1 analysing the uptake glucose activity of mutated neurons and glial cells valuating the expression of facilitated Glucose Transporters 1 and 3. After that we will test the capacity of TGF- β 1 to induce GLUT-1 and 3 mRNA expression and consequently to interfere with glucose metabolism improving cell viability.

Methods

HD Subjects

All participants underwent genetic testing after informed consent and neurological examination, including motor, psychiatric, cognitive, and functional assessments. Age at onset of symptoms was calculated according to the initial neurological manifestations and the predicted time-to-onset in years according to a CAG-based model, as described (Langbehn et al., 2004). Motor symptoms, behavioural and cognitive changes were assessed clinically with the Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996) and Mini-Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975). Subjects' consent was obtained according to the Declaration of Helsinki (Br Med J 1991; 302; 1194). All asymptomatic subjects had no or minimal and nonspecific clinical motor or behavioural manifestations with cognitive scores almost unchanged over the previous 2 years.

The population consists of 30 asymptomatic and 102 symptomatic subjects, classified according to disease stage, sex, age and CAG length. Moreover, asymptomatic subjects were classified according to a parameter called "age to onset": it is a statistical parameter that allows us to estimate the distance to disease onset, is basically based on CAG length and "mean age at onset" of a reference population. The rate of independence decline and symptom progression was measured in loss of units per year using the Disability Scale (DS) (Myers et al., 1991; Marder et al., 2000), in subjects with a disease history of at least five years. The DS combines patients' independence and motor performance, thus taking into account the subjects' independence on neurological motor impairment. The disease stage was calculated according to the Total Functional Capacity (TFC) score (Marder et al., 2000): the maximum value corresponding to subjects with no symptoms is 13, the range between 13 and 10 corresponds to the first stage of the disease, between 9 and 7 stage II, 6 to 3 to stage III, between 2 and first to the fourth stage, up to 0 subject to the fifth stage. In our population we identified 20 patients at the I stage of and 82 between the II and V stage (TAB 1).

Asymptomatic subjects were not taking benzodiazepines or neuroleptics or other drugs for cardiological or psychiatric pathologies, most symptomatic patients were taking

benzodiazepines; some patients in stages IV-V of disease were receiving low doses of atypical neuroleptics (olanzapine, 2.5-10 mg, risperidone, 1-3 mg or tetrabenazine 12.5-25 mg), associated, in some patients, with benzodiazepines, lithium carbonate, or valproate.

Transgenic R6/2 and YAC128 mice

Breeding pairs of the R6/2 line of transgenic mice (strain name: B6CBATgN(HDexon1)62Gpb/J) and of the YAC line of transgenic mice (strain name: FVB-Tg(YAC128)53Hay/J), were purchased from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). The lines were maintained by backcrossing to B6CBAF1 X C57BL/6 F1 and to FVB, respectively. The mice were maintained in the animal facilities of the Neurological Institute Neuromed (R6/2), of University of Alberta (YAC128) and of British Columbia (YAC128), and kept under environmentally controlled conditions (ambient temperature = 22°C, humidity = 40%) on a 12-hour light/dark cycle with food and water *ad libitum*. Experiments were performed following the Guidelines for Animal Care and Use of the National Institutes of Health. Hemizygous transgenic mice were used in all experiments, as was confirmed by PCR according to the protocol by Jackson Laboratories (http://jaxmice.jax.org/public/protocols/protocols.sh?objtype¼ protocol& protocol_id ¼4282). Mice were housed in groups of transgenic and non-transgenic littermates.

Measurements of TGF- β 1 levels in human, mouse serum and cell supernatants

To measure TGF- β 1 levels in human serum, peripheral venous blood samples from HD patients and healthy controls were collected between 8 and 11 a.m.. To minimize possible influence of patients' circadian rhythms on serum TGF- β 1 concentrations, we also confirmed the cytokine levels in blood samples collected between 5 and 7 p.m in a group of 10 patients and 10 control subjects. No age-related differences in TGF- β 1 serum levels were noticed in control subjects, as expected (Grainger et al., 2000), thus excluding the potential bias due to the younger age of asymptomatic subjects. Blood samples were centrifuged at room temperature (3,500 g for 10 min) and serum samples were stored at -80°C until processing. Asymptomatic (4 weeks) and symptomatic (12 weeks) transgenic R6/2 mice and asymptomatic YAC128 mice (2 months) were sacrificed to collect blood and brain tissues. Each group included a total of 15 transgenic asymptomatic mice with respective number of wild-type control

and age-matched mice. The mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of 0.5 ml of Pentoject (sodium pentobarbitone, Animal Ltd., York, UK) and exsanguinated by intracardiac puncture, followed by cervical dislocation. Mouse blood was transferred into a standard 1.5 ml plastic eppendorf tube and allowed to stand for 2 h to clot. The blood was spun at 3,700 g for 5 min and the supernatants were stored at -80°C until processing. Serum TGF- β 1 levels were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (TGF- β 1 Emax Immunoassay System kit Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's instructions.

Serum TGF- β 1 concentrations were measured in four independent experiments. Medium TGF- β 1 levels from knock-in cells were measured using the same kit and according to the manufacturer's instructions.

Measurements of TGF- β 1 levels in mice

Wild-type and R6/2 mice at 4 weeks of age were treated with saline or LY379268 (10 mg/kg, i.p.) and killed 6 hours later. Both cortical cortices and striata were dissected out and immediately homogenized in RIPA buffer for measurements of TGF- β 1 protein levels. The amount of TGF- β 1 protein was assessed by Western blot analysis. Wild-type and R6/2 mice, 4 week old, were also treated with saline or riluzole (10 mg/kg, i.p.), a drug increasing patients' brain (Kato-Semba et al., 2002) and serum (Squitieri et al., 2008) concentration of the brain derived neurotrophic factor (BDNF), and killed 6 hours later. Cerebral cortex and striatum were dissected out and used for TGF- β 1 protein assessment. Brain areas were dissected out from transgenic mice and age-matched controls (4 weeks for R6/2 mice and 2 months for YAC128 mice). Tissues were homogenized at 4°C in a buffer composed of Tris-HCl pH 7.4, 10 mM; NaCl, 150 mM; EDTA, 5 mM; PMSF, 10 mM; Triton X-100, 1%; leupeptin, 1 μ g/ml; aprotinin, 1 μ g/ml with a motor-driven Teflon-glass homogenizer (1700 rev./min). Tissue extracts were used for protein determinations; 30 μ g of proteins were resuspended in SDS-bromophenol blue reducing buffer with 40 mM DTT and used for protein identification. Western blot analyses were carried out using 8% SDS, for mGlu2/3 receptors, and 12.5%, for TGF- β 1, polyacrylamide gels run on a minigel apparatus (Biorad, Mini Protean II Cell); gels were electroblotted on ImmunBlot PVDF Membrane (Biorad, Milano, Italy) for 1 hour using a semi-dry electroblotting system (Biorad, Trans-blot system SD), and filters were blocked overnight in TTBS buffer (100 mM Tris-HCl;

0.9% NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) containing 5% non-fat dry milk. Blots were then incubated for 1 hour at room temperature with a primary polyclonal antibody (2 µg/ml) which recognizes mGlu2/3 receptors (Chemicom International Inc., Tecumela, CA), or overnight at 4°C with a monoclonal anti-human TGF-β1 antibody (1.5 µg/ml, Chemicon International Inc., Temecula, CA) and then incubated for 1 hour with the secondary antibody (1:5000 or 1:10000, peroxidase-coupled anti-mouse, Amersham, Milano, Italy). Immunostaining was revealed by the enhanced ECL western blotting analysis system (Amersham, Milano, Italy). The blots were reprobated with anti-β-actin monoclonal antibody (1:250, Sigma, St. Louis, MO).

Immunocytochemistry for TGF-β1 in human and mouse brain samples

We examined six cases of Huntington's disease, one asymptomatic and eight control subjects. One patient affected by multiple sclerosis was included as positive control expressing high levels of TGF-β1. Subjects' data were obtained from the databases of the department of Neuropathology of the Academic Medical Center (University of Amsterdam, UVA) in Amsterdam and the Department of Neurology of Leiden University Medical Center (LUMC). Informed consent was obtained for the use of brain tissue and for access to medical records for research purposes. Tissue was obtained and used in a manner compliant with the Declaration of Helsinki (Br Med J 1991; 302; 1194). Formalin fixed, paraffin-embedded tissue was sectioned at 6 µm and mounted on organosilane-coated slides (Sigma, St. Louis, MO). Representative sections of all specimens were processed for haematoxylin eosin, as well as for immunocytochemical reactions. The anti-TGF-β1 (LC1-30; purified rabbit antibody) was kindly provided by Dr. K. Flanders, (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA, (Flanders et al., 1989; De Groot et al., 1999). Immunocytochemistry was carried out on paraffin-embedded tissue as previously described (Aronica et al., 2001). The sections were incubated with the primary antibody (1:50) overnight at 4°C. Single-label immunocytochemistry was performed using avidin-biotin peroxidase method for the polyclonal goat antibodies and Powervision (Immunologic, Duiven, The Netherlands) for the monoclonal mouse and polyclonal rabbit antibodies. As chromogen, 3,3-diaminobenzidine was used. Sections incubated without the primary antibody were essentially blank.

Mouse brains were dissected out and immediately placed in a solution composed of ethyl alcohol (60%), acetic acid (10%) and chloroform (30%). Twenty hours later brains

were placed in 70% ethanol until they were included in paraffin. Ten μm serial sections were cut and used for histological analysis. Sections were incubated overnight with rabbit polyclonal anti-TGF- β 1(V) (1:5, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) antibodies, and then for 1 hour with secondary biotinylated anti-rabbit antibodies (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA). 3,3-Diaminobenzidine tetrachloride was used for detection (ABC Elite kit; Vector Laboratories). Control staining was performed without the primary antibodies. Double fluorescence immunohistochemistry was performed by incubating brain sections overnight with polyclonal anti TGF- β 1(V) (1:5) and monoclonal mouse anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (1:100; Sigma-Aldrich; Milan, Italy) or mouse anti-NeuN (1:100; Chemicon, Temecula, CA) antibodies, and then for 1 hour with secondary Cy3 anti-rabbit (1:300; Chemicon) and fluorescein anti-mouse (1:100; Vector, Laboratories) antibodies.

In vitro experiments

Glial cell cultures were prepared from cortex of postnatal CD1 mice (1-3 days after birth). Dissociated cortical cells were grown in 60 mm dishes (Falcon Primaria, Lincoln Park, NJ) using a plating medium of MEM-Eagle's salts supplemented with 10% of heat inactivated horse serum, 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 25 mM sodium bicarbonate and 21 mM glucose. Cultures were kept at 37°C in a humidified CO₂ atmosphere. Confluent cells were transfected (see below) and incubated with LY379268 (1 μM for 10 min), and after the drug washout, cultures were kept for 6-8 hours in the incubator for real time PCR analysis.

Striatal knock-in cultures

Striatal knock-in cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 2 mM L-glutamine and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geneticin (G-418), at 33°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cultures cells were transfected (see below) and incubated with LY379268 (1 μM for 10 min), and after the drug washout, cultures were kept for 6-8 hours (for real time PCR analysis) or 20 hours (for ELISA analysis) in the incubator.

Human fetal glial cells SVG-p12

SVG-p12 cells were grown adherently in DMEM (Mediatech, Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum, at 37°C in 5% CO₂. Cells were transfected as mentioned below with wild-type and mutated constructs.

TGF-β1 treatments and cell viability test

Knock-in striatal cells were incubated with TGF-β1 (2,5 ng/ml) at 37°C in 5% CO₂ for 12 hours. After the incubation cells were rinsed with PBS 1X and collected to test the viability and also to extract mRNA for Real-time analyses.

Viability was measured using Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) staining by citofluorimetric analysis in order to obtain an accurate quantification of apoptosis and to discriminate early apoptosis from late apoptosis/necrosis. Anx-V is a calciumdependent phospholipid-binding protein with a high affinity for phosphatidylserine (PS) and can be used as a marker for the identification of apoptotic cells (Koopman et al. 1994; Vermes et al. 1995). In viable cells, PS is located exclusively on the inner side of the plasma membrane. In the early stages of apoptosis, PS is trans-located from the inner to the outer layer of the plasma membrane, which maintains its integrity preventing propidium entry. However, in the late stages of apoptosis, as the membrane loses its integrity, propidium enters the cell. Anx-V/PI assay can, therefore, be used as a sensitive test to characterize early (Anx-V+/PI-) and late apoptosis/ necrosis (Anx-V+/PI+). Briefly, apoptosis was detected using the human Annexin-V-FITC Kit (Bender MedSystem, Vienna, Austria) according to manufacturer's instructions. Approximately $3 \cdot 10^5$ cells were resuspended in 195 ul of manufacturer-supplied 1-binding buffer and mixed with 5 ul of Annexin V-FITC. After 10 min incubation in the dark at room temperature, the cells were washed, resuspended in binding buffer and stained with 10 ul of the propidium iodide stock solution (20 ug/ml). Finally cells were collected and analyzed.

Cell transfections

All DNA constructs were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Stockholm, Sweden) as instructed by the manufacturer. ST7/7Q, ST111/111Q, mouse primary astrocyte and human fetal glial cells were transfected at 50% of confluence. DNA constructs were exon-1-Htt-25Q-EGFP which express 25 CAG triplets and exon-1-Htt-72Q-EGFP which express 72 CAG triplets. The expression of the green fluorescence protein (EGFP) was used as an index of successful transfection.

Real-time RT-PCR analysis

Total RNA isolated with TRIzol®LS (Invitrogen, Stockholm, Sweden) was treated with DNase I (Qiagen) and retrotranscribed into cDNA by using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Stockholm, Sweden). Real-time RT-PCR was performed on a Step One PCR cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR was performed by using Power SYBR Green PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Thermal cycler conditions were as follows: 5 min at 50°C, 1 min at 95°C, 40 cycles of denaturation (45 s at 95°C), and combined annealing/extension (1 min at 60°C). Gene expression measures were derived from samples run in triplicates. Relative expression was calculated by normalization to β -actin expression using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Primer used: Mouse TGF- β 1: forward 5'- tggaccgcaacaacgccatct -3' e Reverse 5'- ggggggttcgggcactgcttc -3'; Human TGF- β 1: forward 5'-caccggagttgtgcggcagt-3' e Reverse 5'-cggccggtagtgaaaccgtg-3'; Mouse GLUT1 Forward 5'-gcagcagcctgtgtacgccca-3' e reverse 5'-cagccgttccagcaaggcca-3'; Human GLUT1 Forward 5'-atgccccaggtgttcggcct-3' e reverse 5'-ggcccggttctctcgttgc-3'; Mouse GLUT-3 forward 5'-cgccgtgactgttccacga-3' e reverse 5'-agttgcgtctgccaagcgg-3' Mouse Actina Forward 5'- ccacaccgccaccagtgc -3' e reverse 5'- tacagccggggagcatcgt Human Actina Forward 5'-ccaaccgcgagaagatga-3' e reverse 5'-ccagagcgtacagggatag-3'.

Statistical analysis

Student's t-test was used to compare between-group differences in the median age. Statistical differences in serum TGF- β 1 levels among subjects at different HD stage and vs. controls were performed by Student-t test and ANOVA. Linear dependence of serum TGF- β 1 on CAG repeat expansion, time-to-onset in years, DS loss of units per year. Other statistical analyses were performed by Student's t test or One-way ANOVA + Fisher's PLSD. Data were considered statistically significant at $P \leq 0.05$. Statistical analysis was performed with the StatView 5 software.

Results

TGF- β 1 serum levels in HD subjects and healthy controls

The population was divided into controls, asymptomatic and symptomatic subjects at various stages. The analysis was conducted on 55 controls, 30 asymptomatic and 102 symptomatic subjects.

The test highlighted a lower concentration of TGF β -1 in HD subjects serum than controls ($P=0.0002$) (Fig. 1A, B), in particular the levels in asymptomatics and first HD stages (very initial stage) were significantly lower compared to both controls and symptomatic patients (stage II-V) (Fig. 1A). No significant changes in serum TGF- β 1 levels were found between controls and symptomatic patients regardless of their clinical stage (Fig. 1B).

Further investigation revealed a negative correlation between the CAG repeats length and the concentration of TGF- β 1 only in asymptomatic subjects (Fig. 3C) but not in symptomatics (Fig. 3D). We also found a significant correlation ($P=0.029$) with the rate of progression in symptomatic patients (Fig. 1E).

TGF- β 1 expression in the HD brain

We examined the expression of TGF- β 1 by immunohistochemistry in postmortem brain samples of six symptomatic patients (grades III-IV), one asymptomatic subject who was clinically and genetically characterized as described (Maat-Schieman et al., 2007), and eight controls (TAB 2). Expression was also examined in the cerebral cortex of 1 patient with multiple sclerosis, considered as a positive control since we expected increase in microglia immunoreactivity. TGF- β 1 immunoreactive neurons could be detected in both the cerebral cortex and caudate nucleus of all control subjects, whereas no expression was found in cortical or striatal astrocytes, or in the white matter of control subjects. The asymptomatic subject was lack of TGF- β -immunoreactive neurons in the cerebral cortex, and did not show TGF- β 1 immunoreactivity in the white matter (Fig. 2). The caudate nucleus of the asymptomatic subject was not available. In symptomatic patients no expression of TGF- β 1 in cortical neurons and low-to-moderate TGF- β 1 expression in cortical astrocytes, were detected. In contrast, TGF- β 1 was highly expressed in the white matter and

caudate nucleus of symptomatic patients, where reactive astrocytes and microglia showed a strong TGF- β 1 immunoreactivity (Fig. 2; TAB 2).

TGF- β 1 expression in R6 / 2 and YAC128 mouse model

We examined cortical and striatal expression of TGF β -1 in asymptomatic YAC128 and R6/2 mice (8- and 4-week old, respectively) and symptomatic R6/2 mice (12-week old). We found a reduction in cortical levels of TGF β -1 in asymptomatic R6/2 mice and YAC128, but no change in striatum of both models (Fig. 3A; 4A). Symptomatic R6/2 mice also showed a reduced expression of TGF- β 1 levels in the cerebral cortex associated with a slight increase in TGF- β 1 levels in the striatum (Fig. 3D). Immunohistochemical analysis confirmed the reduction in TGF- β 1 levels in the cerebral cortex of asymptomatic R6/2 mice (Fig. 5A), and showed that TGF- β 1 was exclusively localized in cortical neurons of both wild-type and R6/2 mice (Fig. 5B,C). TGF- β 1 levels in serum were reduced in asymptomatic R6/2 mice (Fig. 3E). Serum TGF- β 1 levels were unchanged in asymptomatic YAC128 mice (Fig. 4B).

We also examined whether a defect in the pharmacological regulation of TGF- β 1 formation occurred in asymptomatic R6/2 mice. First, we treated mice with the mGlu2/3 receptor agonist, LY379268 (10 mg/kg, i.p.), which is known to up-regulate the expression of TGF- β 1 in brain tissues (Bruno et al., 1998; D'Onofrio et al., 2001). A single injection of LY379268 increased TGF- β 1 levels in the striatum and cerebral cortex of wild-type mice but did not change TGF- β 1 levels in 4 week old R6/2 mice (Fig. 3A). However, asymptomatic R6/2 mice also showed a reduced mGlu2/3 receptor expression in both cerebral cortex and striatum (Fig. 3B)

Interestingly, an increase in both cortical and striatal TGF- β 1 levels was also observed in mice receiving a single i.p. injection with 10 mg/kg of riluzole (Fig. 3C), a drug that does not interact with mGlu receptors. Similarly to LY379268, riluzole was inactive on cortical and striatal TGF- β 1 levels in asymptomatic R6/2 mice (Fig. 3C).

Reduced expression of TGF- β 1 in murine astrocytes expressing mutant huntingtin

We used cultured cortical astrocytes from mice to determine whether the presence of mutated htt could change the expression and / or the regulation of TGF β -1. Astrocytes were transfected with a mutated construct encoding the human htt containing 72 PoliQ and a wild-type construct encoding for htt with 25 PoliQ. Real-time PCR

analysis showed that the basal expression levels of TGF β -1 were lower in cultures expressing the mutated htt (Fig. 6A). Furthermore, the pharmacological treatment with an agonist of metabotropic glutamate receptor mGlu2 / 3 (LY379268) induced an increased expression of TGF β -1 in control cultures, as expected but had no effect on cultures expressing the mutated htt (Fig. 6A).

Reduced expression of TGF- β 1 in human glial cells expressing mutant huntingtin

Astrocyte cell lines derived from human were transiently transfected with the exon-1-Htt-72Q-EGFP which express 72 CAG triplets (mutated construct) and with exon-1-Htt-25Q-EGFP which express 25 CAG triplets (wild-type construct). We confirmed by real-time PCR analysis that the presence of mutated htt changed the expression of TGF β -1: the basal expression levels were significant lower ($P= 0,0011$) in cultures transfected with mutated construct compared to the control lines (Fig.6B).

Reduced expression of TGF- β 1 in striatal-derived knock-in cells expressing mutated huntingtin

We used immortalized knock-in cells derived from striatal neurons expressing full-length (ST7/7Q, wild-type cells) or full-length mutated huntingtin (ST111/111Q, mhtt cells).

Mutated cell lines (ST111/111) showed reduced TGF β -1 mRNA expression compared to wild-type ST7/7 (Fig. 6C). Moreover, wild-type cells expressed detectable levels of mGlu2/3 receptors and responded to LY379268 with a substantial rise in TGF- β 1 mRNA levels, an effect that was largely attenuated in mutated cells (Fig. 6D). This defective production and regulation was confirmed also at protein level by ELISA measurements of TGF- β 1 released into the cultured medium under basal conditions and in response to a pulse with LY379268 (Fig. 6E).

In wild-type knockin cells, transfection with the expanded exon 1 (72Q) reduced TGF- β 1 mRNA levels (as compared with the unexpanded exon-1). In contrast, expression of the expanded exon-1 did not further reduce TGF- β 1 mRNA levels in mhtt knockin cells (Fig. 6F).

Reduced expression of GLUT-1 and GLUT-3 in striatal neurons and glial cells expressing mutated huntingtin

To verify the putative defective expression of glucose transporters in neuron cells, we used immortalized knock-in cells (ST7/7Q, wild-type cells or ST111/111Q, mh111 cells). Mutated cell lines showed a significant reduction in GLUT-1 and GLUT-3 mRNA expression compared to wild-type ST7/7 ($P=0,01$ and $P< 0,0001$ respectively; Fig 7A, B), demonstrating an effective glucose uptake impairment.

We also used cultured human glial cells to determine whether the presence of mutated htt could change the expression of glucose transporters also in that cell type. Glial cells were transfected with a mutated construct encoding the human htt containing 72 PolyQ and a wild-type construct encoding for htt with 25 PolyQ. Real-time PCR analysis showed that the basal expression levels of GLUT-1 and GLUT-3 were lower in cultures expressing the mutated htt ($P<0,0001$) (Fig 7C, D).

TGF- β 1 stimulates glucose uptake and protects neurons

We examined whether TGF β -1 could stimulate the expression of GLUT-1 and GLUT-3. As shown in Fig.8A, TGF β -1 was able to enhance the expression of GLUT-1 mRNA in a time- and dose-dependent manner. An increase in the expression of GLUT-1 mRNA was observed after 12 hours of treatment with TGF β -1 2,5 ng/ml both in ST7/7 ($P=0,0418$) and more significantly in ST111/111 ($P<0,0001$). Same strategy failed to increase the levels of GLUT-3 mRNA expression.

At the same time we monitored the cell viability by measuring the percentage of apoptotic/necrotic cells at basal condition and after increasing GLUT-1 expression. We found that the increased expression of GLUT-1, as observed after TGF- β 1 treatment, significantly incremented the mutated cell line ST111/111 viability thus reducing cell death due to apoptosis ($P=0,03$) and necrosis ($P=0,03$) (Fig. 8B, C).

Discussion

In order to investigate the role of new potential biomarkers in HD we approached the neurotrophine/mGluR-related excitotoxic mechanisms. The neuroprotective effect of growth factors and their effect on neurodegeneration has been widely reported (Altar et al, 1997; Perez-Navarro et al., 1997; Zuccato et al., 2001; Canals et al., 2004; Gauthier et al., 2004)

Mutated huntingtin loses the ability to increase BDNF gene transcription (Zuccato et al., 2001,2003) and to enhance intracellular trafficking of BDNF (Gauthier et al., 2004; del Toro et al., 2006). In addition, strategies that increase brain levels of BDNF or glial-derived neurotrophic factor (GDNF) are neuroprotective in HD models (McBride et al., 2003, 2006; Squitieri et al., 2008). Recent evidences suggest that the study of neurotrophic factors in HD can be extended to the peripheral blood in an attempt to obtain accessible indicators of disease progression and drug efficacy. Blood levels of BDNF mRNA are progressively reduced in rodent HD models, and can be restored by the neuroprotective drug, CEP-1347 (Conforti et al., 2008). In HD patients, serum BDNF levels are lower than in age-matched controls, and the reduction correlates with the length of CAG repeats in the huntingtin gene, and duration and severity of HD (Ciammola et al., 2007). Thus, the reduction of BDNF levels in peripheral blood may reflect the reduced cortico-striatal production of BDNF associated with HD (Ferrer et al., 2000; Zuccato et al., 2005).

Our data provide the first evidence that changes in TGF- β 1 are associated with HD and raise the intriguing possibility that a defective regulation of this factor contributes to the pathophysiology of neurodegeneration associated with HD. This hypothesis is supported by the emerging role of TGF- β 1 in mechanisms of neuroprotection, and by the evidence that TGF- β 1 is required for the neuroprotective activity of GDNF and of BDNF (Sometani et al., 2001; Lu et al., 2005; Schober et al., 2007).

In HD subjects, we found serum TGF- β 1 levels reduced in asymptomatic and first HD stages, and particularly in asymptomatic patients where it is demonstrated a lower brain glucose metabolism (Ciarmiello et al., 2006). As brain glucose metabolism progressively decreases during the asymptomatic phase of HD (Ciarmiello et al. 2006; Squitieri et al., 2006) we expect that TGF- β 1 levels are critically reduced in a

premanifest life stage thus potentially influencing the times of phenocconversion, the clinical conversion from asymptomatic to symptomatic phase. In our study we demonstrate a crucial role of TGF- β 1 in the glucose transportation by modulating the expression of GLUT1. This mechanism may offer a new field of investigation in the search of biomarkers and new protective therapies. Indeed, by increasing TGF- β 1 levels in mutated cells we increased the levels of GLUT1 and, as a consequence of it, dramatically reduced the cell death. Our experiments on the effect of TGF- β 1 on cell transporters GLUT1 and 3 open a new research field in HD and offer new clues on potential disease markers.

We could examine brain TGF- β 1 expression only in one asymptomatic HD subject. Interestingly, TGF- β 1 was absent in cortical neurons of this subject, whereas it was always detected in cortical neurons of age-matched controls. Data obtained in postmortem samples of symptomatic HD patients confirmed the reduction of TGF- β 1 levels in cortical neurons. In contrast, the examination of the white matter and the caudate nucleus of symptomatic patients was confounded by the high expression of TGF- β 1 in reactive astrocytes and microglia, which overwhelmed any possible change in neuronal TGF- β 1 expression. This was not unexpected because TGF- β 1 has a prominent role in the regulation of the immune response, and is up-regulated in processes of neuroinflammation (see the strong immunoreactivity in the cerebral cortex of the patient with multiple sclerosis). The substantial increase in TGF- β 1 associated with reactive gliosis might, in part, contribute to explain why blood TGF- β 1 increase from the low levels at asymptomatic stage to normality in the symptomatic HD phase, finally correlating with HD severity and progression rate in severely affected patients. Recent evidence indicates that microglia are activated in the striatum of asymptomatic HD gene carriers individuals, and activation correlates with their predicted 5-year probability of developing HD (Björkqvist et al., 2008). It is possible that the amount of TGF- β 1 produced by activated microglia is not sufficient to compensate for the loss of TGF- β 1 in neurons during the asymptomatic phase of the disease, and, therefore, low serum TGF- β 1 levels are detected in spite of microglia activation in asymptomatic HD subjects. It should be highlighted that TGF- β 1 can be produced outside the CNS during inflammation and platelet aggregation (Grainger et al., 2000), and whether these processes are altered in the asymptomatic phase of HD and peripheral pathology is contributing to HD severity, is currently under study (Björkqvist et al., 2008; van der

Burg et al.,2009). However, mutant huntingtin might also directly affect peripheral TGF- β 1 production by cells of the immune system. It should be highlighted that plasma levels of interleukin-6 (IL-6), are higher before clinical onset of HD (Björkqvist et al., 2008). It is possible that a reduced expression of the anti-inflammatory cytokine, TGF- β 1, in the context of an increased expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 (Björkqvist et al., 2008), contributes to immune dysfunction in asymptomatic HD subjects. In support to such hypothesis, the overproduction of several inflammatory cytokines including interleukins in the absence of TGF- β 1, was documented (Shull et al., 1992). Further experiments aimed to test the relationship between reduced presymptomatic levels of TGF- β 1 and increase levels of IL-6 in HD, are required to elucidate the development of the biological process at the presymptomatic life stage.

The reduction in cortical TGF- β 1 levels associated with the asymptomatic phase of HD was confirmed using R6/2 and YAC128 mice(Fig. 3, 4, 5).

YAC128 mice express the full length human huntingtin gene containing 128 CAG repeats, whereas R6/2 mice express exon 1 of the human huntingtin gene with 150 CAG repeats (Mangiarini et al., 1996; Slow et al., 2003). Interestingly, both strains of asymptomatic HD mice showed reduced TGF- β 1 levels in cortical neurons. This reduction might reflect an intrinsic defect of TGF- β 1 formation, or, alternatively, a defect in mechanisms that regulate TGF- β 1 formation in response to environmental factors. However, both HD mice and cells expressing pathological huntingtin showed also an impaired response to extracellular stimuli that enhance TGF- β 1 production. Previous studies have shown that activation of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors (see for a review Schoepp et al., 1999) enhances TGF- β 1 formation in cultured astrocytes and brain tissue (D'Onofrio et al., 2001). Activation of these receptors with compound LY379268 failed to stimulate TGF- β 1 production in R6/2 mice and in astrocytes or knock-in cells expressing huntingtin with an expanded CAG repeat (Fig. 3, 6). As these cells showed normal levels of mGlu2/3 receptors (although receptors were reduced in R6/2 mice), we can conclude that the intracellular machinery regulating the production of TGF- β 1 in response to receptor activation is defective in the presence of mutated huntingtin. The hypothesis that the defect is downstream of mGlu2/3 receptors was supported by the use of riluzole, a drug that is known to enhance the formation of a number of trophic factors, including NGF, BDNF, and GDNF (Flanders et al. 1989; Katoh-Semba et al., 2002; Squitieri et al., 2008). Interestingly,

riluzole was able to enhance the formation of TGF- β 1 in wild-type mice, but was inactive in R6/2 mice (Fig. 3C).

Knowing that TGF- β 1 is anterogradely transported by neurons (Jiang et al., 2000), we speculate that, in the early phase of HD, the striatum is deprived of the amount of TGF- β 1 that is physiologically secreted by cortico-striatal neurons. This might increase the vulnerability of striatal neurons because TGF- β 1 regulates a number of intracellular events that are relevant to processes of neurodegeneration/neuroprotection. TGF- β 1 protects neurons against different insults, including excitotoxicity, hypoxia, ischemia, deprivation of trophic factors and A β toxicity (Wyss-Coray 2006; Vivien and Ali 2006). TGF- β 1 has also a constitutive role in the suppression of inflammation, and appears to control the degree of microglial activation in the CNS (Brionne et al., 2003). TGF- β 1 acts synergistically with other neurotrophins and is required for a full neuroprotective activity of BDNF, and GDNF (Sometani et al., 2001; Lu et al., 2005; Schober et al., 2007), and enhances the expression of BDNF and TrkB in neuronal cultures (Sometani et al., 2001). At cellular level, TGF- β 1 prevents apoptotic neuronal death by inhibiting caspase-3 (Zhu et al., 2001), enhancing the expression of the anti-apoptotic proteins, Bcl-2 and Bcl-xl (Prehn et al., 1996), and inhibiting the pro-apoptotic protein, Bad (Zhu et al., 2002). The anti-apoptotic activity of TGF- β 1 in cultured neurons involves the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and the phosphatidylinositol-3-kinase pathway (Zhu et al., 2004). Established target genes of TGF- β are the “check points” p27 and p21, which produce cell cycle arrest by inhibiting the activity of cyclin-dependent kinases (Datto et al., 1995; Ravits et al., 1996). A lack of TGF- β 1 might facilitate the activation of an abortive mitotic cycle in neurons, an event that has been implicated in the pathophysiology of neuronal death associated with chronic neurodegenerative disorders, including HD (Curtis et al., 2003).

At this stage, we cannot prove whether decreased TGF- β 1 dosage in human serum may represent a asymptomatic marker or its relative increase in advanced stages may suggest a novel marker of HD progression and severity. Additional cross-sectional and longitudinal studies on large populations of HD subjects clinically stratified according to HD stage are required to demonstrate such role of TGF- β 1 as potential biomarker.

In conclusion, our data show that (i) a reduction of TGF- β 1 levels in peripheral blood occurs during the asymptomatic phase of HD; (ii) HD is associated with an early loss of TGF- β 1 in cortical neurons; and (iii) this loss might reflect a defect in the intrinsic

TGF- β 1-producing machinery that makes the factor unresponsive to different stimulating agents. If the early loss in TGF- β 1 contributes to the pathophysiology of neuronal death associated with HD, then strategies that rescue TGF- β 1 levels should limit the progression of HD-related pathology.

ITALIAN VERSION

Introduzione

Malattia di Huntington: perché i biomarcatori sono importanti

La Corea di Huntington (MH) è una malattia neurodegenerativa tra le più diffuse e studiate all'interno del gruppo di patologie causate da espansione poliglutaminica. La prevalenza è di 3-10 soggetti affetti per 100000 individui nei paesi dell'ovest (Rawlins 2010; Spinney 2010).

La malattia è stata descritta la prima volta nel 19th secolo da George Huntington, che identificò sia le sue caratteristiche cliniche che la sua natura ereditaria.

La MH è una patologia genetica neurodegenerativa con eredità autosomica dominante causata da un'espansione instabile di triplette CAG nel gene HTT (Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993; Kremer et al. 1994) che codifica per una proteina chiamata huntingtina (htt).

La lunghezza della mutazione influenza l'età di insorgenza e la progressione, mentre l'espansione omozigote induce una neuropatologia e un decorso più severo (Squitieri et al., 2003). Sebbene l'età di insorgenza dei sintomi più comune è intorno ai 40 anni, la malattia può iniziare molto presto o molto tardi a seconda della penetranza della mutazione (Rubinsztein et al., 1996). Questo fa sì che negli individui a rischio, che si sottopongono ad un test presintomatico e scoprono di avere la malattia, non sia possibile predire l'età di insorgenza dei sintomi solo in base al numero di ripetizioni CAG che influisce sulla variazione dell'età di insorgenza solo per il 60-70%. Altri fattori biologici e ambientali, incluso i geni modificatori possano svolgere una grande influenza sull'inizio e lo sviluppo dei sintomi (Squitieri et al. 2000a; Wexler et al. 2004). Solo quando la mutazione è particolarmente espansa e tossica, la malattia ha inizio in età infantile con effetti devastanti (Quarrel et al. 2009).

Quindi l'impossibilità di predire l'età di insorgenza e la progressione di malattia fra i diversi soggetti, rende la ricerca sui marcatori necessaria per monitorare lo sviluppo dei sintomi nei portatori a rischio e l'andamento patologico nei pazienti. Infatti, marcatori che traccino la progressione di malattia, in individui sintomatici, risultano ugualmente necessari per il monitoraggio di terapie sperimentali. Un buon biomarcatore dovrebbe essere facilmente rilevabile and ottenibile in maniera non-invasiva e soprattutto riflettere un meccanismo patogenetico della malattia. Attualmente non esistono marcatori con queste caratteristiche nella pratica clinica della MH.

Caratteristiche cliniche

I sintomi della malattia includono anomalie motorie come ipercinesie e ipocinesie, sintomi psichiatrici e problemi cognitivi. I disturbi motori sono associati a perdita di coordinazione di movimenti volontari. I movimenti involontari diventano col tempo molto accentuati e il paziente perde sostanzialmente la sua capacità di muoversi e eventualmente comunicare; oltre alla corea altri sintomi sono particolarmente invalidanti come la distonia, i parkinsonismi etc. (Penney et al., 1990; Di Maio et al., 1993).

In circa il 7-8% dei casi la malattia insorge e progredisce in maniera atipica caratterizzata da movimenti volontari o involontari diversi dalla corea chorea (Squitieri et al., 2000b). La corteccia e lo striato sono le aree cerebrali più colpite (Rosas et al., 2008).

La maggior parte dei pazienti va incontro anche a perdita muscolare e di peso, nonostante il costante *intake* calorico (Sanberg et al., 1981; Kirkwood et al., 2001; Djousse et al., 2002). Sebbene la causa dei sintomi periferici non sia chiara, appare sempre più evidente che la causa di queste alterazioni potrebbe essere dovuta ad un effetto diretto dell'mhtt sui tessuti periferici (van der Burg et al., 2009). Studi recenti hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione tra i livelli di alcuni aminoacidi (valina, leucina e isoleucina), la perdita di peso e la progressione di malattia nei pazienti, rinforzando l'importanza che il difetto metabolico svolge nella patologia di MH (Mochel et al., 2007). Inoltre nei pazienti MH sono state riportate una serie di anomalie del sistema endocrino, incluso l'incremento dei livelli di corticosteroidi (Heuser et al., 1991; Leblhuber et al., 1995; Bjorkqvist et al., 2006) o riduzione dei livelli di testosterone (Markianos et al., 2005). I deficit periferici includono anche cambiamenti nei livelli di neurotrofine (Ciammola et al., 2007); un'amplificazione aberrante nelle piastrine da sangue periferico del sito di legame del recettore dell'A(2A) (Varani et al., 2003; Maglione et al., 2005, 2006); cambiamenti nel profilo di pro-cataboliti sierici e metaboliti del plasma (Underwood et al., 2006; Mochel et al., 2007; Forrest et al., 2009), *up-regolazione* di proteine del sistema immune (Dalrymple et al., 2007; Bjorkqvist et al., 2008; Forrest et al., 2009); e disturbi neuroendocrini (Saleh et al., 2009).

Anche i muscoli sono molto colpiti in fase iniziale di malattia (Lodi et al., 2000; Ciammola et al., 2006) e lo sconvolgimento comprende lesioni alle fibre muscolari di tipo I che contribuiscono anche alla perdita di peso dei soggetti (Charturvedi et al.,

2009). Quindi la MH è una malattia sistemica e non semplicemente una patologia che colpisce il SNC, quindi è essenziale focalizzare l'attenzione anche su marcatori periferici.

Meccanismi neuropatologici e eccitotossici

La principale caratteristica patologica è la graduale atrofia dello striato (nucleo caudato, pallido e putamen), dovuto alla morte dei neuroni gaba. Infatti il sistema più comune per determinare il grado di degenerazione (sviluppato da Vonsattel et al., 1985) è basato sul *pattern* di degenerazione striatale del tessuto post-mortem; questo sistema classifica i casi MH in cinque differenti gradi di severità (0-4), con Grado 0 indistinguibile dal cervello normale. Il grado di atrofia striatale correla anche con la degenerazione di altre strutture cerebrali non striatali: la disfunzione intracellulare indotta da mhtt progressivamente porta alla degenerazione neuronale con perdita di importanti *pathway* cellulari, non solo nello striato ma anche nella corteccia e in altre regioni cerebrali (Vonsattel & DiFiglia 1998; Kremer et al., 1990, 1991; Sapp et al., 2001; Kassubek et al., 2004; Petersén et al., 2005).

Sono svariati i meccanismi patogenetici implicati nella MH tra cui: meccanismi di eccitotossicità, difetti metabolici, disfunzioni mitocondriali, stress ossidativo, apoptosi, produzione e trasporto anormale di fattori neurotrofici e autofagia (Beal et al., 1986; Ross 2004; van der Burg et al., 2009). Molti di questi meccanismi incluso l'astrogliosi, potrebbero svilupparsi lentamente e diventare progressivamente più pronunciati negli stadi più avanzati di malattia. In particolare l'attivazione microgliale riflette un processo progressivo di neuroinfiammazione che inizia durante lo stadio asintomatico di malattia e che aumenta nel tempo col progredire della patologia (Sapp et al., 2001; Pavese et al., 2006; Tay et al., 2007).

Gli astrociti e la microglia attivati possono regolare criticamente i processi di morte e sopravvivenza neuronale attraverso la secrezione di glutammato, fattori neurotrofici, citochine pro- e anti- infiammatorie (Shin et al., 2005). La capacità delle cellule gliali di rimuovere il glutammato extracellulare dallo spazio sinaptico potrebbe essere un altro meccanismo in grado di aumentare la vulnerabilità all'eccitotossicità dei neuroni striatali. È stato infatti riportato che nei pazienti MH l'mhtt si accumula nel nucleo delle cellule gliali, abbassando i livelli di espressione dei trasportatori del glutammato. Inoltre, le cellule gliali *wild-type* proteggono i neuroni contro la neurotossicità mediata

dall'mhtt, invece le cellule gliali che esprimono l'mhtt contribuiscono ad aumentare la vulnerabilità neuronale mhtt indotta: questo suggerisce che un abbassamento nell'*uptake* del glutammato da parte delle cellule gliali può esacerbare il meccanismo di eccitotossicità nella MH (Shin et al., 2005).

Questo abbassamento nell'*uptake* di glutammato può essere evidenziato prima della comparsa di neurodegenerazione, suggerendo che il difetto di *uptake* di glutammato è un evento precoce (Liévens et al., 2001).

Concludendo la disfunzione neuronale e la morte cellulare potrebbero derivare da uno sbilanciamento tra fattori neurotossici e neuroprotettivi.

Biomarcatori nella MH

Uno dei principali obiettivi della ricerca su MH è riuscire a predire l'età di insorgenza e la progressione di malattia oltre che monitorare le terapie farmacologiche nei pazienti sintomatici (Squitieri et al., 2009). Al momento non è quindi possibile pensare di riuscire a sviluppare terapie neuroprotettive (Squitieri and Ciarmiello 2010), infatti per effettuare dei passi avanti nella pratica clinica diventa necessario lo sviluppo di biomarcatori. Anche l'identificazione di potenziali marcatori all'interno o all'esterno del SNC (*dry* e *wet*) non sarebbe sufficiente per consentirne l'utilizzo di nella pratica clinica ammenochè non si sia in grado di seguirne i cambiamenti nel tempo per ogni singolo soggetto (Esmailzadeh et al., 2010). Un biomarcatore deve riflettere un meccanismo neuropatologico e dovrebbe essere validato in soggetti con mutazione MH. La strategia giusta potrebbe essere quella di combinare una serie specifica di diversi "*wet biomarkers*", insieme con dati di *imaging* (*dry biomarkers*) e parametri clinici per ottenere una diagnosi precoce e differenziale e allo stesso tempo confrontare la validità di diversi metodi.

Diverse strategie possono essere applicate per identificare la molecola giusta: come la stratificazione della popolazione di pazienti, la scelta della miglior fonte da cui ottenere informazioni, la sensibilità, la stabilità e la standardizzazione dei metodi. Il biomarcatore ideale dovrebbe essere rilevabile con un metodo non invasivo, quantificabile ed affidabile e riflettere un meccanismo patologico centrale.

Per far questo si rende necessario l'utilizzo di diversi sistemi "in vivo" e "in vitro" (Mangiarini et al., 1996; Slow et al., 2003; Van Raamsdonk et al., 2005a Trettel et al.,2000).

Banca dati dei soggetti MH al Neuromed

Abbiamo raccolto dati clinici e genetici sui pazienti e le loro famiglie presso l'Unità di Neurogenetica, IRCCS Neuromed di Pozzilli (IS). I dati su circa 1000 soggetti portatori di mutazione sono stati inclusi in una banca dati, insieme con il DNA, il siero e altri tessuti dei soggetti. I pazienti vengono accolti e visitati nel servizio ambulatoriale del Neuromed. L'età di insorgenza è stabilita considerando le manifestazioni motorie e psichiatriche con l'utilizzo di scale riconosciute come Unified Huntington Disease Rating Scale (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996) e Mini-Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975) per la valutazione di sintomi motori, cognitivi, comportamentali e di progressione di malattia. Il database comprende tutti i dati personali, la storia familiare, genetica e i dettagli clinici riguardanti l'età d' esordio, la progressione della malattia, la durata di malattia etc. Abbiamo anche informazioni riguardanti i soggetti a rischio, infatti al Neuromed dal 1998 è stato istituito un programma di test predittivi secondo le linee guida etiche internazionali (Cannella et al., 2001).

Modelli cellulari e animali nel Neuromed

Linee cellulari da pazienti MH. Contemporaneamente alla banca di DNA abbiamo anche stabilito una banca di linee cellulari: differenti tipi di linee cellulari sono state ottenute dai pazienti dopo aver firmato un consenso che ci permette di utilizzare i campioni a scopo di ricerca e dopo l'approvazione del Comitato Etico. Attualmente abbiamo a disposizione differenti sistemi cellulari periferici come: linee linfoblastoidi (120 linee), ottenute da linfociti primari immortalizzati con Epstein-Barr Virus (EBV); linee di mioblasti primari (20 linee) e fibroblasti (20 linee), ottenuti da biopsie muscolari e cutanee. Tutte le cellule sono state ottenute da pazienti eterozigoti e omozigoti con diversi *range* di lunghezza del tratto CAG, e ovviamente da individui sani di controllo.

Cellule gliali umane SVG-p12. Le SVG-p12 sono cellule fetali umane gliali ottenute dall' ATCC Company. Queste cellule sono immortalizzate con SV40 e sono state transfettate con l'esone-1-Htt-25Q-EGFP che esprime 25 CAG e l'esone-1-Htt-72Q-EGFP che esprime 72 CAG.

Colture cellulari striatali da topi knock-in. Le cellule striatali sono state ottenute da topi HdhQ111 knock-in, tali cellule esprimono l'huntintina full-length STQ7/Q7, o la full-length mutata STQ111/Q111 (Trettel et al., 2000). Queste cellule sono molto utilizzate per studiare la patogenesi della MH. La linea cellulare ST111/111Q esprime la mhtt a livelli endogeni: visto che lo striato è la regione più colpita nella MH, l'origine striatale di queste cellule rende questo modello ottimale per studiare la disregolazione trascrizionale e il metabolismo del glucosio dato che sono stati descritti numerosi deficit energetici e disregolazioni proprio nella linea mutata (Milakovic e Johnson 2005; Seong et al.2005).

Topo transgenico R6/2: esprime l'Esone 1 del gene umano htt con 150 CAG; l'espressione del transgene è guidata dal promotore umano (Mangiarini et al., 1996). Il fenotipo di questi animali ripercorre alcuni sintomi e segni comuni nella patologia umana (Li et al., 2005). Esibiscono cambiamenti neurologici e neuro endocrini incluso movimenti simil-coreici, tremori, epilessia etc. Lo sviluppo dei sintomi è precoce e rapidamente porta alla formazione di aggregati/inclusioni prima nello striato e poi in corteccia intorno alle 3-4 settimane (Meade et al., 2002). Nei topi R6/2, i primi sintomi appaiono alla 4° settimana di età, fino a questo periodo sono considerati come modello asintomatico. Di solito cominciano a manifestare sintomi più gravi alla 8-12° settimana,

mostrando atrofia muscolare intorno all'8° (Sathasivam et al., 1999) per morire tra la 12-14° settimana di vita.

YAC128: è ampiamente diffuso e utilizzato, contiene l'intero gene umano htt (128CAG) all'interno di un cromosoma di lievito; è stato creato e caratterizzato dal gruppo di Micheal Hyden (Slow et al., 2003; Van Raamsdonk et al., 2005a). Lo YAC128 mostra anomalie motorie che progrediscono a partire dal 3° mese fino al 6°. Anche i *deficit* comportamentali sono progressivi e dal 12° mese significativamente evidenti rispetto ad un topo sano. Mostrano una modesta atrofia striatale a partire dal 9° mese che aumenta anche nella corteccia fino al 12° mese (10–15% e 7–8% di decremento in volume, rispettivamente). L'immunoreattività alla htt nucleare è presente nello striato e altri neuroni a partire dal 2° mese. I sintomi appaiono al 3° mese .

Razionale

Come precedentemente sottolineato, nella patofisiologia della MH un ruolo molto importante è svolto dall'alterata attività e produzione di fattori neurotrofici. L'mhtt infatti è in grado di ridurre la trascrizione genica del fattore neurotrofico BDNF (Zuccato et al., 2001, 2003) e di ostacolare il suo traffico intracellulare (Gauthier et al., 2004; Del Toro et al., 2006). Inoltre strategie atte ad aumentare i livelli di BDNF e del fattore neurotrofico GDNF, sono protettivi in modelli MH (Bemelmans et al., 1999; Perez-Navarro et al., 1999; Duan et al., 2003; Kells et al., 2004; McBride et al., 2003, 2006; Pineda et al., 2007; DeMarch et al., 2008; Gharami et al., 2008; Squitieri et al., 2008; Erbert et al., 2010). Lo studio dei fattori neurotrofici nella MH può essere esteso in periferia per ottenere degli indicatori accessibili ed affidabili di progressione di malattia ma anche di monitoraggio di terapie farmacologiche. Per esempio, nei pazienti MH i livelli di BDNF sierico sono risultai più bassi che nei relativi controlli raggruppati per età, questa riduzione correla con la lunghezza delle CAG, e con la durata e severità della malattia (Ciammola et al., 2007), e potrebbe inoltre essere recuperata da farmaci potenzialmente neuroprotettivi (Squitieri et al., 2008, 2009). Quindi la riduzione dei livelli sierici di BDNF potrebbe riflettere una ridotta produzione cortico-striatale associata alla malattia (Ferrer et al., 2000; Zuccato et al., 2005, 2008).

A questo punto ci siamo, quindi, focalizzati su un fattore di crescita in particolare e cioè il TGF β -1: un fattore ampiamente riconosciuto come neuroprotettivo e che potrebbe avere un ruolo importante nella patologia della neurodegenerazione (Bruno et al., 1998; Krieglstein et al., 1998).

Infatti il TGF β -1 svolge numerose funzioni cellulari incluso il controllo del ciclo vitale, la regolazione di alcune fasi dello sviluppo, differenziazione e formazione della matrice extracellulare, nonché nell'ematopoiesi, angiogenesi, chemiotassi e funzioni immuni (Dennler et al., 2002). In particolar modo sembra essere coinvolto in numerose patologie neurodegenerative e danni ischemici. Inoltre la sua espressione è correlata ad un progressivo aumento di attivazione microgliale e deposizione di PrP (proteina prionica) (Boche et al., 2006). E' stato dimostrato come tale fattore sia in grado anche di ridurre l'attivazione della caspasi-3 e di diverse molecole infiammatorie (Kim et al., 2004).

La risorsa principale di TGF β -1 nel tessuto cerebrale danneggiato sono gli astrociti e la microglia (Finch et al., 1993), sebbene anche i neuroni ne producano una certa quantità (Flanders et al., 1998). Il TGF β -1 contribuisce a mantenere un livello di integrità e sopravvivenza neuronale all'interno del SNC, regolando anche l'attivazione microgliale (Brionne et al., 2003).

In accordo con quanto finora detto, nel cervello di pazienti affetti da malattia di Alzheimer è stata dimostrata un'alterata espressione dei recettori di tipo II del TGF β -1 (Tesseur et al., 2006; Ueberham et al., 2006), ed è stato dimostrato nel modello murino di tale patologia che una riduzione nel segnale del TGF β -1 aumenta la deposizione di amiloide e quindi la neurodegenerazione (Tesseur and Wyss-Coray 2006).

Il ruolo del TGF β -1 è stato studiato anche in numerose altre malattie neurodegenerative come la Sclerosi Laterale Amiotrofica (ALS) (Ilzecka et al., 2002), il Parkinson (PD) e la malattia Prionica (Boche et al., 2006), ma mai prima di adesso nella MH.

Inoltre, l'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato mGlu3 a livello gliale ha un ruolo protettivo in grado di controllare la produzione di fattori come l'NGF e il TGF β -1, suggerendo che l'attivazione di questi recettori (mGlu3) possa promuovere una nuova forma di interazione neuroni-glia mediata dalla sintesi e rilascio di possibili fattori neuro protettivi (Bruno et al., 1998; D'Onofrio et al., 2001; Corti et al., 2007).

Nei topi transgenici R6/2 (modello MH), che esprimono l'esone 1 umano con la mutazione, è stata dimostrata una perdita di tali recettori a livello dello striato (Cha et al., 1998). Inoltre in topi eterozigoti *knock-out* per il gene TGF β -1, i ridotti livelli di tale fattore fanno aumentare la suscettibilità al danno eccitotossico e la neurodegenerazione (Brionne et al., 2003). In aggiunta, topi transgenici deficienti di TGF β -1 sviluppano una suscettibilità allo stimolo tossico (Brionne et al., 2003). La produzione del TGF β -1 è sotto il controllo di segnali extracellulari, che includono estrogeni e amminoacidi eccitatori che agiscono a livello dei recettori metabotropici mGlu3 (Bruno et al., 1998; Sortino et al., 2004) e l'attivazione di questi recettori è neuroprotettiva attraverso un meccanismo paracrino che è mediato dal TGF β -1 (Bruno et al., 1998; D'Onofrio et al., 2001; Corti et al., 2007). Inoltre il TGF β -1 è richiesto per l'attività neuroprotettiva di numerosi altri fattori neurotrofici come il GDNF (Shober et al., 2007) e il BDNF (Sometani et al., 2001; Lu et al., 2005).

Una ragione in più per indagare sul TGF β -1 ce la fornisce inoltre il possibile *link* di questo fattore con il difetto energetico del metabolismo presente nella MH, in

particolare con il trasporto del glucosio (Kitagawa et al., 1991; Masumi et al., 1993; Inoki et al., 1999). Da analisi di PET effettuate sullo striato di soggetti malati è emerso un grave difetto del metabolismo del glucosio già in fasi molto precoci (Ciarmiello et al., 2006; Esmailzadeh et al., 2010). Infatti, l'ipometabolismo striatale è stato osservato già in fase asintomatica di malattia (Feigin et al., 2001; Ciarmiello et al., 2006). Alcuni ricercatori hanno inoltre evidenziato una carenza nei complessi respiratori II, III e IV in cervelli post-mortem di malati, nei quali era evidente la morte neuronale (Mann et al., 1990; Gu et al., 1996; Browne et al., 1997).

Possiamo quindi dedurre che il difetto intracellulare di metabolismo del glucosio può essere attribuito ad un blocco all'interno della cascata di eventi glicolitici (Powers et al., 2007) ma anche ad una carenza nel rifornimento del glucosio dovuto a un decremento del trasporto all'interno della cellula (Gamberino and Brennan 1994).

Mentre la prima ipotesi è stata ben studiata e compresa in diversi modelli per MH (Milakovic and Johnson 2005; Seong et al., 2005), poche sono invece le conoscenze riguardo le condizioni fisiologiche di trasporto del glucosio.

Il trasporto del glucosio dal sangue al cervello richiede il passaggio dalle cellule endoteliali alla barriera emato-encefalica e poi nei neuroni e glia. I trasportatori di glucosio facilitati sono le proteine che mediano questo processo. La principale isoforma nel cervello è rappresentata da GLUT1, presente come forma altamente glicosilata (55 kDa) e in concentrazioni elevate soprattutto nella barriera emato-encefalica; invece in forma meno glicosilata, (45 kDa) soprattutto nel parenchima e quindi nella glia; GLUT3 si trova nei neuroni; e GLUT5 in microglia. Il resto della famiglia dei trasportatori, GLUTs 2, 4, e 7, sono stati individuati in tutto il cervello, ma a livelli di espressione più bassi e confinati a regioni più discrete. Tutti i trasportatori contribuiscono all'utilizzazione del glucosio cerebrale, (per review vedere Vannucci et al., 1997; Spector 2009).

Nella MH è stata evidenziata una carenza nel caudato di trasportatori del glucosio GLUT-1 e 3 in campioni post-mortem (I-II grado) (Gamberino e Brennan, 1994).

Il TGF β -1 sembrerebbe migliorare l'assorbimento di glucosio e quindi la glicolisi sia nei fibroblasti che nelle cellule mesangiali inducendo un aumento di espressione di GLUT-1 (Masumi et al., 1993; Kitagawa et al., 1991; Inoki et al., 1999). Supponendo che il trasporto del glucosio sia difettoso nel SNC di soggetti affetti e cioè nei neuroni e cellule gliali, allora possiamo ipotizzare che aumentando i livelli di TGF β -1, e quindi aumentando l'espressione di GLUT-1 e GLUT-3 saremmo anche in grado di migliorare

l'assorbimento del glucosio, riducendo i danni dovuti ai difetti di metabolismo energetico e quindi riducendo la morte neuronale.

Scopo del lavoro

L'obiettivo del nostro studio è identificare un nuovo target in grado di agire come un potenziale biomarcatore, ma allo stesso tempo che sia in grado di modificare alcuni aspetti del meccanismo patologico della MH.

Il nostro studio, pertanto, si occuperà di indagare il ruolo del TGF β -1 e dei recettori metabotropici del glutammato (mGlu) nel meccanismo di neurodegenerazione/neuroprotezione, usando campioni prelevati da soggetti malati o portatori di mutazione o da modelli animali; in particolare analizzeremo il sangue e il cervello e verificheremo se il meccanismo patologico della malattia possa essere in qualche modo legato ai livelli di TGF β -1.

Quindi prima di tutto:

1. analizzeremo i livelli di TGF β -1 circolanti nel siero di una larga popolazione di soggetti a diverso stadio di malattia, inclusi individui asintomatici e controlli raggruppati per età.
2. analizzeremo i livelli di espressione del TGF β -1 in campioni di cervello umano stratificati per regioni (dallo stadio asintomatico allo stadio avanzato di malattia), paragonando i livelli con quelli dei controlli sani e di pazienti affetti da altre neuropatologie degenerative in cui la citochina è potenzialmente implicata.

Studieremo l'attività neuroprotettiva del TGF β -1 analizzando il suo ruolo collaborativo con gli mGlu2/3 usando alcuni sistemi *in vivo* e *in vitro* come:

- (i) modelli murini transgenici R6/2 e YAC128 (centrale e periferia)
- (ii) cellule neuronali striatali derivate da topi *knock-in* (HdhCAG150)
- (iii) cellule astrogliali da topo e gliali umane (SVG-p12) transientemente transfettate con un costrutto esprimente 25 CAG (controllo) exon-1-Htt-25Q-EGFP e uno esprimente 72 CAG (mutato) exon-1-Htt-72Q-EGFP.

Analizzeremo inoltre la relazione tra il trasporto del glucosio e il TGF β -1 valutando innanzitutto l'espressione di GLUT-1 e GLUT-3 nelle cellule neuronali e gliali e conseguentemente la capacità del TGF β -1 di poter indurre un aumento di espressione di tali trasportatori incrementando il metabolismo del glucosio e la vitalità cellulare.

Metodi

Soggetti HD

Tutti i partecipanti allo studio sono stati sottoposti a test genetici dopo aver firmato il consenso informato e ad esami neurologici, che hanno consentito di valutare l'età di insorgenza dei sintomi. L'età di insorgenza dei sintomi è stata calcolata in accordo con la valutazione sintomatologica e la lunghezza del tratto CAG mutato come già descritto (Langbehn et al., 2004).

I sintomi motori, i disturbi comportamentali e cognitivi sono stati valutati secondo i criteri stabiliti dall' Huntington Study Group, utilizzando scale motorie (UHDRS e TFC) e scale cognitive (MMSE) (Huntington Study Group, 1996; Folstein et al 1975). Tutti i partecipanti hanno firmato un accordo concorde con la dichiarazione Helsinki (Br Med J 1991; 302; 1194). Tutti i soggetti asintomatici non hanno manifestato sintomi neanche lievi nel corso dei due anni precedenti lo studio.

La popolazione oggetto di studio è costituita da 30 asintomatici o "mutation carriers" e 102 sintomatici, classificati in base allo stadio di malattia, al sesso, all'età e alla lunghezza del tratto espanso.

Inoltre i soggetti asintomatici sono stati classificati in base ad un parametro che definiamo "distanza di malattia" o *age- to- onset*: che è un parametro statistico che consente di effettuare una stima approssimativa dell'inizio della malattia; è in pratica una predizione in base alla lunghezza del tratto che viene comparato con la popolazione di riferimento. La perdita di indipendenza e la progressione dei sintomi è stata misurata in termini di perdita di unità per anno usando la Disability Scale (DS) (Myers et al., 1991; Marder et al., 2000), in soggetti malati da almeno 5 anni. Il valore DS combina le abilità motorie e di indipendenza sulla base dei problemi motori neurologici. I soggetti sintomatici sono stati stratificati per stadio di malattia dal I° al V° in base alla capacità funzionale totale (TFC) (Marder et al., 2000): il valore massimo corrispondente a soggetti che non presentano sintomi è di 13, il range tra 13 e 10 corrisponde ad un I° stadio di malattia, tra 9 e 7 al II° stadio, tra 6 e 3 al III° stadio, tra 2 e 1 al IV° stadio, fino a 0 per soggetti al V° stadio. Nella nostra popolazione abbiamo individuato 20 soggetti al I° stadio di malattia e 82 tra il II e il V stadio (TAB 1). I soggetti asintomatici non erano sotto trattamento con benzodiazepine e neurolettici o altri farmaci per patologie cardiache e psichiatriche; alcuni sintomatici stavano prendendo

benzodiazepine; qualche paziente tra il IV-V stadio basse dosi di neurolettici (olanzapina, 2.5-10 mg, risperidone, 1-3 mg or tetrabenazina 12.5-25 mg) associate in alcuni con litio o valproato.

R6/2 e YAC128

Le linee R6/2 (ceppo: B6CBATgN(HDexon1)62Gpb/J) e YAC (ceppo: FVB-Tg(YAC128)53Hay/J), sono fornite dalla Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Le linee vengono mantenute incrociando B6CBAF1 X C57BL/6 F1 e a FVB, rispettivamente. I topi sono mantenuti al NEUROMED (R6/2), o all'Università di Alberta (YAC128) e British Columbia (YAC128), e tenuti sotto ambiente controllato (temperatura = 22°C, umidità = 40%) in ciclo 12-ore luce/buio con cibo e acqua *ad libitum*. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti seguendo le linee guida "Animal Care and Use of the National Institutes of Health". La tipizzazione dei topi è stata effettuata con PCR in accordo al protocollo fornito dalla Jackson Laboratories (http://jaxmice.jax.org/pub-cgi/protocols/protocols.sh?objtype/4_protocol&protocol_id/4282).

Rilevamento dei livelli di TGF β -1 nel siero umano e da topo e surnatanti cellulari

Per misurare i livelli di TGF β -1 nel siero, i campioni di sangue sono stati prelevati nei pazienti e nei controlli fra le 8.00 e le 11.00 del mattino. Per minimizzare le possibili influenze dei cicli circadiani sui livelli di concentrazione del TGF β -1, abbiamo anche controllato i livelli in prelievi effettuati tra le 5 e le 7pm in un gruppo di 10 pazienti e 10 controlli. Non sono state inoltre rilevate differenze significative tra gruppi di età diverse come già precedentemente riportato (Grainger et al., 2000), escludendo in questo modo il potenziale bias dovuto alla più giovane età degli asintomatici. I campioni sono stati centrifugati a temperatura ambiente a 3500g per 10 minuti e sono stati conservati a -80°C fino al momento del dosaggio. I topi R6/2 asintomatici (4 settimane) e sintomatici (12 settimane) e gli YAC128 asintomatici (2 mesi) sono stati sacrificati per estrarre il sangue e i tessuti cerebrali. Ogni gruppo include un totale di 15 topi asintomatici con i rispettivi controlli *wild-type* raggruppati per età. I topi sono stati anestetizzati con una iniezione intraperitoneale di 0,5 ml di Pentobarbitone (pentobarbitone di sodio, Animal Ltd., York, UK) e *esanguinati* attraverso puntura intracardiaca, seguita da dislocazione cervicale. Il sangue è stato poi trasferito in eppendorf di 1,5 ml e fatto coagulare per 2 ore a temperatura ambiente. Il sangue è stato poi centrifugato a 3700 g per 5 minuti e il surnatante conservato a -80°C fino al

processamento. Il TGF β -1 è stato dosato utilizzando il test ELISA con il kit TGF β -1 Emax ImmunoAssay System della Promega, in accordo alle istruzioni manifatturiere. Ogni test è stato ripetuto in 4 esperimenti separati. Per il dosaggio nel surnatante cellulare delle cellule striatali è stata utilizzata la stessa procedura come indicato dalle istruzioni della casa manifatturiera.

Misura dei livelli di TGF β -1 nei topi

Topi *wild-type* and R6/2 a 4 settimane, dopo essere stati anestetizzati, sono stati trattati, tramite iniezione intraperitoneale, con soluzione salina o LY379268, un agonista dei recettori metabotropici del glutammato mGlu2/3, ad una concentrazione di 10 mg/kg; dopo 6 ore sono stati sacrificati. Tramite dissezione, sono stati prelevati i tessuti corticali e striatali, che sono stati immediatamente omogeneizzati in buffer di lisi per la misurazione dei livelli di TGF β 1.

I livelli sono stati determinati tramite Western Blot. Inoltre i topi a 4 settimane sono stati anche trattati con soluzione salina o Riluzolo (10 mg/kg, i.p.) un farmaco che è stato dimostrato alzare i livelli di BDNF sia nel cervello (Kato-Semba et al., 2002) che in periferia (Squitieri et al., 2008). I topi dopo 6 ore di trattamento sono stati sacrificati. La corteccia e lo striato sono stati dissezionati e utilizzati per dosare il TGF β -1. Il tessuto è stato omogenato a 4°C in un buffer di lisi composto da Tris-HCl pH 7.4, 10 mM; NaCl, 150 mM; EDTA, 5 mM; PMSF, 10 mM; Triton X-100, 1%; leupeptin, 1 μ g/ml; aprotinin, 1 μ g/ml, e quindi omogenato con un Teflon-glass homogenizer (1700 rev./min). Il campione è stato quindi utilizzato per la determinazione proteica: 30 μ g di proteine totali sono state risospese in un buffer riducente composto da SDS-bromophenol blue con 40 mM DTT. L'analisi di WB è stata effettuata utilizzando un gel di poliacrilammide all'8% per mGlu2/3 e al 12,5% per il TGF β 1. Sono stati utilizzati 30 μ g di proteina totale. Dopo trasferimento di 1 h su membrana PVDF (Biorad) i filtri sono stati bloccati overnight in TTBS buffer (100mM Tris-HCl; 0,9% NaCl; 0,1% Tween 20, pH 7,4) al 5% milk. È stata poi effettuata un'incubazione di 1 h a temperatura ambiente con anticorpo policlonale per il recettore mGlu2/3 (2 μ g/ml) (Chemicom International Inc., Tecumela, CA), e overnight a 4°C con anticorpo monoclonale per anti-TGF β 1 umano (1,5 μ g/ml, Chemicom International Inc., Tecumela, CA). È seguita un'incubazione di 1 h con anticorpo secondario perossidasi marcato (1:5000). Il segnale è stato poi rilevato tramite ECL (Amersham, Milano, Italy). Gli stessi filtri sono stati poi riibridati per valutare l'espressione dell'actina

utilizzando l'anticorpo monoclonale anti- β actina alla concentrazione di 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO).

Immunoistochimica per TGF beta 1 su cervelli da soggetti HD e modello murino R6/2

Abbiamo esaminato sei casi di MH conclamata, un asintomatico e otto soggetti di controllo. Un paziente affetto da sclerosi multipla è stato incluso come controllo positivo essendo noto che i soggetti con questo tipo di patologia esprimono alti livelli di TGF β -1. I campioni e i dati sui soggetti sono stati forniti dal Dipartimento di Neuropatologia del *Academical Medical Center* (Università di Amsterdam, UVA) ad Amsterdam e il Dipartimento di Neurologia della *Leiden University Medical Center* (LUMC). Il consenso informato è stato ottenuto per l'uso del tessuto cerebrale e per l'accesso alle cartelle cliniche per scopi di ricerca. Il tessuto è stato utilizzato in modo conforme alla Dichiarazione di Helsinki (Br Med J 1991; 302, 1194). Il tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina è stato sezionato a 6 micron e montato su vetrini organo-silane rivestiti (Sigma, St. Louis, MO). Sezioni rappresentative di tutti i campioni sono stati trattati per ematossilina eosina, così come per le reazioni immunocitochimiche. L'anticorpo LC1-30 per il TGF β -1 è stato gentilmente fornito dal Dr. K. Fiandre, (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA,) (Fiandre et al., 1989; De Groot et al. , 1999). L'immunocitochimica è stata condotta su tessuto incluso in paraffina come descritto in precedenza (Aronica et al., 2001). Le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario (1:50) overnight a 4 ° C. Sono stati utilizzati i rispettivi anticorpi secondari ed è stato utilizzato il metodo PowerVision (Immunologiche, Duiven, Paesi Bassi) per la rilevazione del segnale, è stata inoltre confermata la non *cross*-reattività del secondario facendo un'incubazione senza anticorpo primario.

I cervelli di topo sono stati sezionati e immediatamente posti in una soluzione composta di alcool etilico (60%), acido acetico (10%) e cloroformio (30%). Dopo 20 ore sono stati collocati in etanolo al 70% fino a che non sono stati inclusi in paraffina. Sono state tagliate sezioni seriali di dieci micron e utilizzate per l'analisi istologica. Le sezioni sono state incubate overnight con un anticorpo policlonale per il TGF β -1 (v) (1:5, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), e poi per 1 ora con l'anticorpo secondario biotinilato (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Il tetracloruro di 3,3-diaminobenzidina è stato utilizzato per la rilevazione (ABC kit Elite; Vector Laboratories). Il controllo della colorazione è stato eseguito senza l'aggiunta degli anticorpi primari. La doppia immunoistochimica-fluorescenza è stata effettuata

incubando le sezioni del cervello con un anticorpo policlonale anti-proteina acida fibrillare gliale (GFAP) (1:100; Sigma-Aldrich, Milano, Italia) o l'anti-Neun (1:100; Chemicon, Temecula, CA), e poi per 1 ora con Cy3 secondario (1:300; Chemicon) e anti fluoresceina (1:100; Vector Laboratory).

Esperimenti “in vitro”

Le cellule gliali sono state preparate dalla corteccia di topi *wild-type* a 1-3 giorni di vita. Le cellule corticali sono state cresciute nelle piastre da 60 mm in MEM-Eagle's salts al 10% HS, 10% FBS, 2 mM glutamina, 25 mM bicarbonato di sodio e 21 mM glucosio. Le colture sono state mantenute a 37°C al 5% di CO₂. Sono state trasfettate (vedi di seguito) e incubate con LY379268 (1 µM per 10 min); dopo aver effettuato il lavaggio dal farmaco, sono state raccolte a 6-8 ore per gli esperimenti di real time PCR.

Colture cellulari striatali da topi knock-in

Le cellule striatali vengono cresciute in Dulbecco's modified Eagle's al 10% di FBS, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina, 2 mM L-glutamina e 400 µg/ml geneticina (G-418), a 33°C al 5% CO₂. Le colture sono state trasfettate al 50% di confluenza (vedi di seguito) e poi incubate con LY379268 (1 µM per 10 min), il farmaco è stato lavato via dal terreno e le cellule sono state raccolte dopo 6-8 ore per gli esperimenti di real time PCR o dopo 20 ore per i test ELISA.

Cellule gliali umane SVG-p12

Le SVG-p12 sono state coltivate in adesione con DMEM integrato con 10% di siero fetale bovino, a 37 ° C in 5% CO₂. Le cellule sono state transfettate con l'esone-1-Htt-25Q-EGFP che esprime 25 CAG e l'esone-1-Htt-72Q-EGFP che esprime 72 CAG.

Trattamenti con TGF-β1 su colture neuronali e test di vitalità

Le cellule neuronali striatali sono state incubate con TGF-β1 (2,5 ng/ml) a 37°C in 5% CO₂ per 12 ore. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate con PBS 1X e raccolte per effettuare il test di vitalità e per l'estrazione di RNA per l'analisi di Real-Time.

La vitalità cellulare è stata calcolata usando il metodo dell'Annessina/Ioduro di propidio attraverso l'analisi al citofluorimetro. Con questo metodo riusciamo ad ottenere una stima precisa dei livelli di apoptosi ed inoltre a discriminare tra apoptosi e necrosi. ANX-V è una proteina legante i fosfolipidi calcio- dipendente con un'alta affinità per la fosfatidilserina (PS) e può essere utilizzata come *marker* per l'identificazione di cellule apoptotiche (Koopman et al. 1994; Vermes et al. 1995). Nelle cellule vitali, PS si trova

esclusivamente sul lato interno della membrana plasmatica, nelle prime fasi dell'apoptosi PS trans-migra da quello interno allo strato esterno della membrana plasmatica, che mantiene la sua integrità impedendo l'ingresso del propidio. Tuttavia, nelle ultime fasi dell'apoptosi, la membrana perde la sua integrità, e il propidio entra nella cellula. Il saggio può pertanto essere utilizzato come un test sensibile per caratterizzare l'apoptosi tardiva / necrosi. Il kit utilizzato è Annexin-V-FITC Kit (Bender MedSystem, Vienna, Austria) e il protocollo è stato eseguito come da istruzioni del produttore. Circa $3 \cdot 10^5$ cellule sono state risospese in 195 μ l di buffer fornito dal produttore e *mixato* con 5 μ l di annessina V-FITC. Dopo 10 min di incubazione al buio a temperatura ambiente, le cellule sono state lavate, risospese in tampone di legame e marcate con 10 μ l della soluzione di ioduro di propidio (20 μ g / ml). Infine, le cellule sono state raccolte e analizzate.

Trasfezioni cellulari

Tutti i costrutti sono stati trasfettati utilizzando il kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Stockholm, Sweden) come indicato dalla ditta produttrice. Le cellule striatali ST7/7Q e ST111/111Q, gli astrociti murini e le gliali umane SVG-p12 sono state trasfettate ad una confluenza del 50%. I costrutti utilizzati sono stati l'esone-1-Htt-25Q-EGFP che esprime 25 CAG e l'esone-1-Htt-72Q-EGFP che esprime 72 CAG. L'espressione della EGFP è stata usata come indice di avvenuta trasfezione, controllata sia tramite microscopio a fluorescenza che FACS. Le cellule sono state utilizzate dopo 24-48 ore dalla trasfezione.

Real-time RT-PCR

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il TRIzol®LS (Invitrogen, Stockholm, Sweden) e poi digerito con DNase I (Qiagen) per evitare possibili contaminazioni da DNA. L'RNA è stato retro trascritto usando il kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Stockholm, Sweden). La Real-time RT-PCR è stata effettuata utilizzando una Step One PCR cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La PCR è stata eseguita utilizzando il Kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Le condizioni utilizzate sono state: 5 min a 50°C, 1 min a 95°C, 40 cicli di 45 s a 95°C, e 1 min a 60°C. L'espressione relativa è stata calcolata utilizzando la β -actin come normalizzatore e il metodo dei $\Delta\Delta$ Ct. Le sequenze dei primer utilizzati sono :

Mouse TGF- β 1: forward 5'- tggaccgcaacaacgcatct -3' e Reverse 5'- ggggggttcgggcactgcttc -3'. Human TGF- β 1: forward 5'-caccggagtgtgctggcagt-3' e Reverse 5'-cggccggtagtgaacccttg-3'; Mouse GLUT1 Forward 5'-

gcagcagcctgtgtacgccca-3' e reverse 5'-cagccgtccagcaaggcca-3'; Human GLUT1 Forward 5'-atcggccaggtgttcggcct-3' e reverse 5'-ggcccggttctctctcgttgc-3'; Mouse GLUT-3 forward 5'-cgccgtgactgttccacga-3' e reverse 5'-agttgcgtctgccaagcggt-3' Mouse Actina Forward 5'- ccacaccgccaccagtgc -3' e reverse 5'- tacagcccggggagcatcgt Human Actina Forward 5'-ccaaccgcgagaagatga-3' e reverse 5'-ccagaggcgtacagggatag-3'.

Analisi statistica

Lo Student t-test è stato utilizzato per confrontare le differenze tra singoli gruppi. Le varie differenze di TGF- β 1 sierico tra i soggetti a diverso stadio e i controlli vs HD sono stati eseguiti con T test Student e ANOVA. La correlazione dei valori di espressione con l'espansione CAG, o il *time-to-onset*, o la perdita DS di unità all'anno e le altre analisi statistiche sono state effettuate con il T test Student o one-way ANOVA + Fisher PLSD. I dati con $p \leq 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata effettuata con il software 5 Statview.

Risultati

TGF β -1 nel siero di soggetti MH

La popolazione è stata suddivisa in controlli, asintomatici e pazienti sintomatici a vari stadi. L'analisi è stata condotta su 55 controlli, 30 asintomatici e 102 sintomatici. Il test ci ha consentito di evidenziare una più bassa concentrazione di TGF β -1 nel siero dei soggetti MH rispetto alla popolazione di controllo ($P=0.0002$) (Fig. 1A, B); in particolare i livelli nei pazienti asintomatici e sintomatici al I stadio (fase molto iniziale di malattia) sono risultati significativamente più bassi sia rispetto ai controlli, che ai pazienti sintomatici (II -V stadio) (Fig. 1A). Non abbiamo rilevato nessun significativo cambiamento tra i livelli di TGF β -1 nel siero tra controlli e pazienti sintomatici in relazione allo stadio clinico (Fig. 1B). Un'indagine più approfondita ha evidenziato una correlazione negativa tra la lunghezza del tratto mutato e la concentrazione del TGF β -1 solo nei soggetti asintomatici (Fig 3C), ma non in quelli sintomatici (Fig 3D). E' stata anche rilevata una correlazione significativa ($P=0.029$) con la progressione in pazienti sintomatici (Fig. 1E)

Espressione del TGF- β 1 in campioni di cervello umano

Abbiamo esaminato l'espressione del TGF β -1 per immunistochemica in campioni di cervello umano post mortem: in particolare 6 pazienti sintomatici (stadio classificato tra III-IV), un soggetto asintomatico e otto controlli.

Tutti i soggetti MH sono stati clinicamente e geneticamente caratterizzati (Maat-Schieman et al., 2007) (TAB 2). Inoltre l'espressione è stata valutata anche nella corteccia di un paziente con sclerosi multipla, considerandolo come controllo positivo in quanto in questa patologia ci sono numerose prove di immunoreattività microglia con aumento del TGF β -1. La citochina è stata evidenziata nei neuroni sia della corteccia cerebrale che del nucleo caudato di tutti i soggetti di controllo, mentre non è stata trovata immunoreattività negli astrociti corticali e striatali, e nella sostanza bianca dei soggetti di controllo. Il soggetto asintomatico possiede bassissimi livelli di TGF beta 1 nei neuroni corticali e ne manca totalmente nella sostanza bianca (Fig. 2). Il nucleo caudato del soggetto asintomatico non era disponibile. I neuroni corticali dei pazienti sintomatici non hanno mostrato alcuna espressione di TGF β -1 anche gli astrociti corticali possiedono solo una bassa-moderata reattività, al contrario hanno mostrato una forte immunoreattività sia gli astrociti che la microglia del nucleo caudato e della

sostanza bianca. Il controllo positivo ha mostrato un'elevata immunoreattività sia neuronale che astro gliale a livello della corteccia (Fig.2; TAB 2)

Espressione del TGF β -1 nei modelli murini R6/2 e YAC128

Abbiamo esaminato l'espressione del TGF β -1 in corteccia e striato di topi R6/2 a 4 settimane e topi YAC128 a 8 settimane, cioè in fase asintomatica, e degli R6/2 a 12 settimane (fase sintomatica). Abbiamo potuto osservare una riduzione dei livelli corticali di TGF β -1, ma nessun cambiamento a livello striatale in entrambe i modelli (Fig 3A, 4B). Il topo R6/2 sintomatico ha mostrato una ridotta espressione del TGF β -1 in corteccia ma non nello striato (Fig. 3D). L'analisi immunoistochimica sugli R6/2 ha confermato la riduzione in corteccia a 4 settimane (Fig. 2), e ha mostrato che il TGF- β 1 è quasi esclusivamente localizzato nei neuroni corticali, anche nel topo wild-type (Fig. 5A) e ha mostrato che il TGF β -1 è quasi esclusivamente localizzato nei neuroni corticali sia dei *wild-type* che degli R6/2 (Fig.5B,C). Abbiamo inoltre dosato i livelli di TGF β -1 nel siero di questi animali trovandoli ridotti negli R6/2 a 4 settimane ma non negli YAC128 allo stesso stadio (Fig 3E, 4B).

Abbiamo inoltre voluto verificare se un difetto nella regolazione farmacologia della formazione di TGF β -1 potesse essere rilevata nei topi asintomatici R6/2. Abbiamo quindi trattato i topi con LY379268 (10 mg/kg i.p.), un agonista dei recettori metabotropici del glutammato mGlu2/3, che è risaputo indurre un incremento nella produzione di TGF β -1 nel cervello (Bruno et al., 1998; D'Onofrio et al., 2001). Una singola iniezione di LY379268 ha incrementato i livelli di TGF β -1 nello striato e nella corteccia dei topi wild-type, ma non è stato osservato nessun cambiamento nei topi R6/2 a 4 settimane (Fig 3A).

Inoltre l'espressione dei recettori mGlu2/3 è significativamente ridotta nei topi R6/2 a 4 settimane sia in corteccia che striato (Fig 3B). Abbiamo inoltre osservato che con una singola iniezione i.p. di Riluzolo (10 mg/kg) (Fig. 3C) siamo stati in grado di indurre un aumento del TGF β -1 sia in corteccia che striato nei topi normali ma non nei topi R6/2 (Fig. 3C).

Ridotta espressione del TGF β -1 in colture di astrociti primari esprimenti l'mhtt

Abbiamo utilizzato colture di astrociti primari per verificare se la presenza dell'mhtt potesse modificare l'espressione e/o la regolazione del TGF β -1. Le colture sono state trasfettate con un costrutto codificante per l'mhtt umana contenete 72 PoliQ e uno codificante per l'htt *wild-type* con 25 PoliQ. L'analisi di real-time PCR ha mostrato che i livelli basali di mRNA di TGF β -1 erano più bassi nelle colture esprimenti l'mhtt

(Fig 6A). Inoltre il trattamento farmacologico con un agonista dei recettori metabotropici del glutammato mGlu2/3 (LY379268), ha indotto un aumento dell'espressione del TGF β -1 nelle colture di controllo, come atteso, ma non ha avuto effetto sulle colture esprimenti l'mhtt (Fig 6A).

L'espressione del TGF- β 1 è ridotta nelle cellule gliali umaneSVG-p12 esprimenti l'mhtt

Le cellule gliali di derivazione umana sono state trasfettate transientemente con il costrutto exon-1-Htt-72Q-EGFP che esprime 72 CAG (costrutto mutato) e con il costrutto exon-1-Htt-25Q-EGFP che esprime 25 CAG (costrutto *wild-type*). L'analisi di Real time PCR ci ha confermato che la presenza dell'mhtt cambia l'espressione basale del TGF β -1 riducendola (P= 0,0011) rispetto al controllo (le stesse cellule trasfettate con il costrutto *wild-type*) (Fig.6B).

Espressione del TGF β -1 in cellule striatali derivate da topi knock-in esprimenti l'mhtt

Abbiamo utilizzato cellule striatali murine esprimenti l'htt *full-length* ST7/7Q (*wild-type*) o la *full-length* mutata ST111/111Q, derivate da topi *knock-in*.

Le cellule mutate ST111/111 hanno mostrato una ridotta espressione basale dell'mRNA per il TGF β -1 rispetto alle *wild-type* ST7/7 (Fig 6C). Inoltre, dopo trattamento farmacologico con LY379268, i livelli di TGF β -1 sono risultati aumentati nelle ST7/7 ma non nelle ST111/111, dato confermato sia per Real Time PCR (Fig 6D), che misurando i livelli di TGF β -1 nel surnatante cellulare tramite test ELISA (Fig 6E).

La trasfezione delle cellule ST7/7Q con il costrutto mutato con 72 PoliQ ha ridotto i livelli di mRNA del TGF β -1 rispetto alle condizioni basali (cellule trasfettate con il costrutto normale). La stessa trasfezione nelle ST111/111Q non ha evidenziato ulteriori riduzioni nei livelli di espressione del TGF β -1 (Fig 6F).

Ridotta espressione di GLUT-1 e GLUT-3 nei neuroni e cellule gliali esprimenti l'mhtt

Per verificare un difetto di espressione dei trasportatori del glucosio nell'MH abbiamo inizialmente valutato i livelli di mRNA di GLUT1 e 3 nelle cellule knock-in ST7/7Q, esprimenti l'htt *wild-type* e le ST111/111Q esprimenti l'mhtt. La linea mutata ha infatti evidenziato una significativa riduzione dell'espressione di GLUT-1 e GLUT-3 rispetto al controllo (Fig. 7A, B P=0,01 e P< 0,0001 rispettivamente), dimostrando un effettivo difetto nell'*uptake* di glucosio.

Abbiamo voluto verificare se anche le cellule gliali mostrassero lo stesso andamento: abbiamo quindi trasfettato le SVG-p12 con i costrutti già precedentemente utilizzati contenenti 72 CAG e 25 CAG. Le cellule trasfettate con i costrutti mutati hanno mostrato una sostanziale riduzione nell'espressione dei due trasportatori ($P < 0,0001$) (Fig 7 C,D).

Il TGF- β 1 stimola l'uptake di glucosio nei neuroni

A questo punto abbiamo verificato se un trattamento con TGF β -1 potesse indurre un miglioramento nell'*uptake* di glucosio tramite l'induzione dell'espressione dei trasportatori GLUT-1 e GLUT-3. Come mostrato in fig 8 A il TGF β -1 è in grado di indurre un aumento nei livelli di mRNA di GLUT-1 in maniera tempo e dose dipendente. Infatti l'aumento dell'espressione è stato osservato dopo 12 ore di trattamento con concentrazioni di 2,5 ng/ml. L'aumento è risultato significativo sia nelle cellule ST7/7Q ($P=0,0418$) che nelle ST111/111Q ($P < 0,0001$). Con le stesse condizioni non abbiamo invece evidenziato l'aumento dell'espressione di GLUT-3.

Nello stesso tempo abbiamo valutato la vitalità cellulare sia in condizioni basali che dopo trattamento con TGF β -1, cioè dopo induzione dell'espressione di GLUT-1. Abbiamo misurato la percentuale di apoptosi e necrosi. Abbiamo evidenziato un significativo recupero di vitalità nelle ST111/111Q, dopo trattamento con TGF β -1, con riduzione sia di apoptosi ($P=0,03$) che di necrosi ($P=0,03$) (Fig. 8B, C).

Discussione

Al fine di indagare il ruolo di nuovi potenziali biomarcatori in MH ci siamo avvicinati allo studio delle neurotrofine e meccanismi legati all'eccitotossicità. L'effetto neuroprotettivo dei fattori di crescita e il loro effetto sulla neurodegenerazione è stato ampiamente riportato (Altar et al, 1997; Perez-Navarro et al, 1997;. Zuccato et al, 2001;. Canals et al, 2004;. Gauthier et al. 2004).

L'mhtt mutata induce un decremento nella trascrizione del gene del BDNF (Zuccato et al, 2001,2003.) e un deficit nel suo traffico intracellulare (Gauthier et al, 2004;. del Toro et al, 2006). Inoltre, le strategie che aumentano i livelli cerebrali di BDNF o GDNF sono neuroprotettivi in modelli di MH (McBride et al, 2003, 2006;. Squitieri et al, 2008). Evidenze recenti suggeriscono che lo studio dei fattori neurotrofici può essere estesa al sangue periferico, nel tentativo di ottenere biomarcatori di progressione della malattia e di efficacia farmacologica. I livelli ematici di mRNA del BDNF sono progressivamente ridotti nei modelli murini MH e possono essere ripristinati dal farmaco neuroprotettivo, CEP-1347 (Conforti et al., 2008). Nei pazienti, i livelli sierici di BDNF sono inferiori rispetto ai controlli raggruppati per età, e la riduzione correla con la lunghezza delle CAG e la durata e la gravità della malattia (Ciammola et al., 2007). Così, la riduzione dei livelli di BDNF nel sangue periferico può riflettere la minore produzione cortico-striatale di BDNF associato alla MH (Ferrer et al, 2000;. Zuccato et al, 2005).

I nostri dati forniscono la prima prova che i livelli di TGF- β 1 sono associati con la MH e propongono l'intrigante possibilità che un regolamento difettoso di questo fattore contribuisca alla patofisiologia della neurodegenerazione associata a MH. Questa ipotesi è sostenuta dal ruolo emergente di TGF- β 1 in meccanismi di neuro protezione, il TGF- β 1 è infatti necessario per l'attività neuroprotettiva di GDNF e di BDNF (Sometani et al, 2001;. Lu et al. , 2005; Schober et al, 2007). 1 Nei soggetti MH i livelli di TGF- β 1 nel siero, sono ridotti in particolare in pazienti asintomatici e sintomatici ai primi stadi, insieme ad un dimostrato ridotto metabolismo del glucosio cerebrale (Ciarmiello et al., 2006). Poiché il metabolismo del glucosio cerebrale diminuisce progressivamente durante la fase asintomatica di HD (Ciarmiello et al 2006; Squitieri et al, 2006) ci aspettiamo che i livelli TGF- β 1 notevolmente ridotti in una fase della vita prima della comparsa dei sintomi, possa influenzare il passaggio alla conversione clinica cioè alla

fase sintomatica. Nel nostro studio abbiamo dimostrato un ruolo cruciale del trasporto del glucosio modulando l'espressione di GLUT1 attraverso il TGF- β 1. Questo meccanismo può offrire un nuovo campo di indagine nella ricerca di biomarcatori e nuove terapie di protezione. In effetti, aumentando i livelli di TGF- β 1 in cellule mutate abbiamo aumentato i livelli di GLUT1 e, come conseguenza, drasticamente ridotto la morte cellulare. I nostri esperimenti sugli effetti del TGF- β 1 sui trasportatori cellulari GLUT1 e 3 apre un nuovo campo di ricerca e offre nuovi indizi sui potenziali marcatori di malattia.

Nei soggetti asintomatici e ai primi stadi di malattia abbiamo evidenziato ridotti livelli di TGF- β 1 sierico. I livelli di TGF- β 1 nel sangue sono invece aumentati in fase sintomatica, rispetto ai soggetti asintomatici, raggiungendo quasi i livelli di normalità della popolazione controllo (Fig. 1 A, B). Questi risultati concordano con i livelli di TGF- β 1 riscontrati a livello cerebrale (Fig. 2): è interessante notare che la citochina è risultata assente nei neuroni corticali del soggetto asintomatico, mentre è stata sempre evidenziata nei neuroni corticali dei controlli raggruppati per età. I pazienti sintomatici hanno mostrato una riduzione dei livelli di TGF- β 1 nei neuroni corticali e invece un'alta espressione negli astrociti e microglia della materia bianca e del nucleo caudato. Questo non era inaspettato perché il TGF- β 1 ha un ruolo importante nella regolazione della risposta immune, ed è *up*-regolato nei processi di neuroinfiammazione (vedi la forte immunoreattività della corteccia cerebrale del paziente con sclerosi multipla). Il considerevole aumento di TGF- β 1 associato a infiammazione e gliosi reattiva potrebbe anche spiegare l'aumento dei livelli ematici in fase avanzata: il TGF- β 1 potrebbe essere prodotto al di fuori del sistema nervoso centrale durante un processo di infiammazione periferica o aggregazione piastrinica (Grainger et al, 2000), presente ma meno evidente in fase asintomatica e progressivamente aumentato nel corso dello sviluppo dei sintomi (Björkqvist et al., 2008; van der Burg et al., 2009).

Tuttavia, l'ipotesi potrebbe anche influenzare direttamente la produzione periferica del TGF- β 1. Occorre sottolineare che i livelli plasmatici di interleuchina-6 (IL-6), sono più alti prima della manifestazione clinica della malattia (Björkqvist et al., 2008). È possibile che una ridotta espressione della citochina anti-infiammatoria, TGF- β 1, nel contesto di una aumentata espressione di citochine pro-infiammatorie, come l'IL-6 (al Björkqvist et al., 2008), contribuisca a disfunzioni immunitarie nei soggetti asintomatici, tale ipotesi è stata dimostrata (Shull et al., 1992). Ulteriori esperimenti

potranno chiarire il processo biologico che lega l'aumento di IL-6 in fase presintomatica e la riduzione dei livelli di TGF- β 1.

La riduzione dei livelli di TGF- β 1 in fase asintomatica è stata confermata anche nella corteccia di modelli "*in vivo*", come i topi R6 / 2 e YAC128 (Fig. 3, 4, 5). I topi YAC128 esprimono l'intero gene umano dell'huntingtina contenente un tratto di 128 ripetizioni di CAG, mentre i topi R6 / 2 esprimono l'esone 1 del gene umano con 150 ripetizioni CAG (Mangiarini et al, 1996; Slow et al, 2003). È interessante notare che entrambi i ceppi di topo asintomatici hanno mostrato una riduzione dei livelli di TGF- β 1 nei neuroni corticali. Questa riduzione potrebbe riflettere un difetto intrinseco di formazione del TGF- β 1, o, in alternativa un difetto nei meccanismi che regolano la risposta del TGF- β 1 a fattori ambientali esterni. Infatti, entrambi i modelli animale e cellulare (esprimenti l'huntingtina a livello patologico) hanno mostrato una risposta alterata a stimoli extracellulari che solitamente dovrebbero aumentare la produzione di TGF- β 1. Studi precedenti hanno mostrato che l'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato mGlu2/3 (vedi per review al Schoepp et al., 1999) dovrebbero indurre la formazione di TGF- β 1 in astrociti in coltura e tessuto cerebrale (D'Onofrio et al., 2001). Tuttavia l'attivazione di questi recettori, ad opera dell' LY379268, non è riuscita a stimolare la produzione di TGF- β 1 in topi R6 / 2, in astrociti e cellule knock-in che esprimono huntingtina espansa (Fig. 3, 6). Poiché queste cellule hanno mostrato livelli normali di recettori mGlu2/3 (anche se i recettori sono invece ridotti negli R6/2), possiamo concludere che il macchinario intracellulare che regola la produzione di TGF- β 1 in risposta all'attivazione di tali recettori è difettoso in presenza di huntingtina mutata.

L'ipotesi che il difetto sia a valle dei recettori mGlu2/3, è stata rafforzata dall'utilizzo di riluzolo, un farmaco che è risaputo incrementare la formazione di una serie di fattori trofici, tra cui NGF, BDNF e GDNF (Fiandre et al 1989; Katoh-Semba et al, 2002; Squitieri et al, 2008). È interessante notare che il riluzolo è stato in grado di incrementare la formazione di TGF- β 1 nei topi *wild-type*, ma è stato inefficace negli R6/2 (Fig. 3C).

Poiché il TGF- β 1 è anterogradamente trasportato nello striato dai neuroni corticali (Jiang et al., 2000), si può ipotizzare che anche lo striato ne sia carente, in una fase iniziale di malattia. Ciò potrebbe aumentare la vulnerabilità dei neuroni striatali regolando una serie di eventi intracellulari rilevanti per i processi di neurodegenerazione

/ neuro protezione come eccitotossicità, ipossia, ischemia, deprivazione di fattori trofici e A β tossicità (Wyss-Coray 2006; Vivien e Ali 2006). Il TGF- β 1 ha anche un ruolo importante nella soppressione dell'inflammatione, e sembra controllare l'attivazione della microglia nel sistema nervoso centrale (Brionne et al., 2003). Inoltre il TGF- β 1 agisce in sinergia con le altre neurotrofine ed è necessario per una piena attività neuroprotettiva di BDNF e GDNF (Sometani et al, 2001;. Lu et al, 2005;.. Schober et al, 2007), aumentando l'espressione del BDNF stesso e di TrkB nelle culture neuronali (Sometani et al., 2001). A livello cellulare, il TGF- β 1 previene la morte neuronale apoptotica inibendo la caspasi-3 (Zhu et al., 2001), migliorando l'espressione delle proteine anti-apoptotiche, Bcl-2 e Bcl-XL (Prehn et al., 1996), e inibendo la proteina pro-apoptotica Bad (Zhu et al., 2002). L'attività anti-apoptotica di TGF- β 1 nei neuroni comporta l'attivazione del MAPK e la via del fosfatidilinositolo-3-chinasi (Zhu et al., 2004). Alcuni target dell'attività del TGF- β 1 sono i così chiamati "*check-point*" del ciclo cellulare" e cioè p27 e p21, che producono l'arresto del ciclo cellulare, inibendo l'attività della chinasi ciclina-dipendente (Datto et al, 1995;.. Ravits et al, 1996). Una mancanza di TGF- β -1 potrebbe facilitare l'attivazione di un ciclo mitotico abortivo nei neuroni, un evento implicato nella fisiopatologia della morte neuronale associata a malattie neurodegenerative, tra cui la MH (Curtis et al., 2003).

In questa fase non siamo in grado di dimostrare che il TGF- β 1 nel siero degli asintomatici possa rappresentare un biomarcatore predittivo o, che il suo relativo aumento in fase avanzata, possa suggerire un nuovo marcatore di progressione della patologia.

In conclusione, i nostri dati mostrano che (i) una riduzione nei livelli di TGF- β 1 del sangue periferico si verifica durante la fase asintomatica di malattia (ii) la MH è associata ad una perdita precoce di TGF- β 1 nei neuroni corticali, e (iii) questa perdita potrebbe riflettere un difetto nel meccanismo intrinseco di produzione del TGF- β 1- che rende il fattore non responsivo a diversi agenti stimolanti. Quindi strategie che siano in grado di indurre un aumento di TGF β 1 nelle cellule possono portare ad una riduzione della mortalità neuronale, migliorando l'assorbimento del glucosio.

Per dimostrare, inoltre, il ruolo del TGF- β 1 come potenziale biomarcatore serviranno ulteriori studi trasversali e longitudinali su una estesa popolazione di soggetti clinicamente stratificati in base allo stadio di malattia.

TABLES, FIGURES AND LEGENDS

Figure 1 – Serum TGF- β 1 levels in Huntington’s disease subjects.

Reduced serum TGF- β 1 levels in asymptomatic and stage-I HD subjects (A). TGF- β 1 levels in control (Ctrl) and all life stage subjects are shown in (B). Statistical analysis was carried out by Student’s t test in (A) and by One-way ANOVA + Fisher PLSD in (B). Linear dependence of serum TGF- β 1 levels on expanded CAG repeat number in asymptomatic subjects is shown in (C) ($n=30$, $R^2=0.16$, $P=0.0067$). The lack of correlation between serum TGF- β 1 levels and the number of expanded CAG repeats in symptomatic patients is shown in (D). (E) Patients with disease length beyond five years and manifest HD (stages II-V) showed a slight but significant linear dependence of serum TGF- β 1 levels on the rate of progression of the disease, calculated as loss of units of the disability scale per year ($n=54$, $R^2=0.10$, $P=0.029$).

Figura 1 – Livelli sierici di TGF- β 1 levels in soggetti MH.

Ridotti livelli di TGF- β 1 negli asintomatici e sintomatici I stadio (A). Livelli di TGF- β 1 nei controlli (Ctrl) e soggetti a diverso stadio (B). Analisi statistica eseguita con Student’s t test in (A) e One-way ANOVA + Fisher PLSD in (B). Dipendenza lineare dei livelli di TGF- β 1 nel siero in individui asintomatici con le ripetizioni CAG (C) ($n=30$, $R^2=0.16$, $P=0.0067$). Mancanza di correlazione tra livelli di TGF- β 1 nel siero dei sintomatici e le ripetizioni CAG (D). (E) Pazienti malati da almeno 5 anni (II-V stadio) con dipendenza lineare con la progressione di malattia, calcolata come perdita di unità di DS per anno ($n=54$, $R^2=0.10$, $P=0.029$).

Figure 2 - TGF- β 1 Immunohistochemistry in postmortem brain samples of HD and non HD subjects

Immunohistochemistry for TGF- β 1 in representative postmortem samples of the cerebral cortex, white matter and caudate nucleus of a control subject, a symptomatic patient, an asymptomatic subject, and a patient with multiple sclerosis. Note the substantial loss of TGF- β 1 in cortical neurons of the asymptomatic subject.

Figura 2 –Immunoistochimica in cervelli postmortem di soggetti MH e non

Immunoistochimica sul TGF- β 1 in campioni post-mortem di corteccia cerebrale, sostanza bianca e nucleo caudato di un soggetto di controllo, un paziente sintomatico, un soggetto asintomatico, e un paziente con sclerosi multipla. Da notare che in neuroni corticali del soggetto asintomatico hanno una sostanziale carenza di TGF- β 1.

Figure 3 - TGF- β 1 levels in the cerebral cortex, striatum, and peripheral blood of asymptomatic or symptomatic R6/2 mice.

Immunoblot analysis of TGF- β 1 in the cerebral cortex and striatum of wild-type, and asymptomatic (4 weeks of age) R6/2 mice is shown in (A). Mice were also treated with a single i.p. injection of saline or LY379268 (10 mg/kg). Values are means \pm S.E.M. of 6 determinations. $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in mice treated with saline (*) or vs. the respective values obtained in wild-type mice (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD). A representative immunoblot is also shown. Immunoblot analysis of mGlu2/3 receptors in the cerebral cortex and striatum of asymptomatic R6/2 mice is shown in (B), where values are means \pm S.E.M. of 6 determinations. * $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in wild-type mice (Student's t test). Immunoblot analysis of TGF- β 1 in the cerebral cortex and striatum of wild-type and asymptomatic R6/2 mice treated with a single i.p. injection of saline or riluzole (10 mg/kg) is shown in (C). Values are means \pm S.E.M. of 5-6 determinations. $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in mice treated with saline (*) or vs. the respective values obtained in wild-type mice (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD). Immunoblot analysis of TGF- β 1 in the cerebral cortex and striatum of wild-type and symptomatic (12 weeks of age) R6/2 mice is shown in (D). Values are means \pm S.E.M. of 5-6 determinations. * $P < 0.05$ (Student's t test) vs the respective values obtained in age matched wild-type mice. Serum TGF- β 1 levels in wild-type, asymptomatic and symptomatic R6/2 mice are shown in (E), where values are means \pm S.E.M. of 6 determinations. $P < 0.05$ vs. values obtained in age-matched wild-type mice (*) (Student's t test).

Figura 3 - Livelli di TGF- β 1 nella corteccia cerebrale, striato, e sangue periferico di topi R6 / 2 asintomatici o sintomatici.

Immunoblot sui livelli di TGF- β 1 nella corteccia cerebrale e striato di topi wild-type e R6 / 2 asintomatici (4 settimane di età) (A). I topi sono stati trattati con una singola iniezione i.p. di soluzione salina o LY379268 (10 mg / kg). I valori sono stati calcolati su una media \pm S.E.M. di 6 determinazioni. $P < 0.05$ vs i rispettivi valori ottenuti nei topi trattati con soluzione salina (*) o contro i rispettivi valori ottenuti nei topi wild-type (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD). Immunoblot analisi dei recettori mGlu2 / 3 a livello della corteccia cerebrale e striato di topi R6 / 2 asintomatici

(B). I valori sono stati calcolati su una media \pm S.E.M. di 6 determinazioni. * P <0.05 vs i rispettivi valori ottenuti nei topi wild-type (Student t test). Immunoblot sul TGF- β 1 nella corteccia cerebrale e striato di topi wild-type e R6 / 2 asintomatici trattati con una unica iniezione i.p. di soluzione salina o di riluzolo (10 mg / kg) (C).). I valori sono stati calcolati su una media \pm S.E.M. di 6 determinazioni. P <0.05 vs i rispettivi valori ottenuti nei topi trattati con soluzione salina (*) o contro i rispettivi valori ottenuti nei topi wild-type (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD). Immunoblot sul TGF- β 1 nella corteccia cerebrale e striato di topi wild-type e R6 / 2 sintomatici (12 settimane di età)

(D). I valori sono stati calcolati su una media \pm S.E.M. di 6 determinazioni. * P <0.05 (Student t test) vs i rispettivi valori ottenuti in topi wild-type raggruppati per età. Livelli di TGF- β 1 nel siero di topi wild-type e R6 / 2 asintomatici e sintomatici (E), valori sono stati calcolati su una media \pm S.E.M. di 6 determinazioni. P <0.05 vs valori ottenuti in topi wild-type di stessa età (*) (Student t test).

Figure 4 - TGF- β 1 in transgenic YAC128 mice brain and peripheral serum.

Immunoblot analysis of TGF- β 1 in the cerebral cortex and striatum of wild-type and asymptomatic YAC128 mice (8 weeks of age) is shown in (A). Densitometric values are means \pm S.E.M. of 5-7 determinations. *P<0.05 (Student's t test) vs. the corresponding values obtained in wild-type mice. Serum TGF- β 1 levels in wild-type and asymptomatic YAC128 mice are shown in (B), where values are means \pm S.E.M. of 5-7 determinations.

Figura 4 - TGF- β 1 in cervello e siero di topi transgenici YAC128

Immunoblot di TGF- β 1 nella corteccia cerebrale e striato di topi wild-type e YAC128 asintomatici (8 settimane di età) (A). I valori densitometrici sono medie + S.E.M. di 5-7 determinazioni. * P <0.05 (Student t test) rispetto ai corrispondenti valori ottenuti nei topi wild-type. Livelli di TGF- β 1 nel siero di topi wild-type e YAC128 asintomatici (B).

Figure 5 - Immunohistochemical analysis of TGF- β 1 in wild-type and asymptomatic R6/2 mice

Immunohistochemical analysis of TGF- β 1 in a representative wild-type and asymptomatic R6/2 mouse is shown in (A). Arrowheads indicate the zone showed at higher magnification. Double fluorescent staining for TGF- β 1 and GFAP, or TGF- β 1 and NeuN in cortical neurons of a representative wild-type and asymptomatic R6/2 mouse is shown in (B) and (C), respectively. Note that TGF- β 1 is expressed in neurons and not in astrocytes.

Figure 5 - Immunoistochimica sul TGF- β 1 in topi wild-type and R6/2 asintomatici

Analisi immunoistochimica sul TGF- β 1 in topi wild-type e R6 / 2 asintomatici (A). Le freccia indicano la zona a più alto ingrandimento. La doppia fluorescenza sul TGF- β 1 e GFAP, o TGF- β 1 e NeuN in neuroni corticali di un topo wild-type rappresentativo e R6 / 2 asintomatico (B) e (C) rispettivamente. Da notare che il TGF- β 1 è espresso nei neuroni e non negli astrociti.

Figure 6 - Analysis of TGF- β 1 in murine astrocytes and human glial cells expressing exon-1 htt 72Q and striatal-derived knock-in cells expressing full-length huntingtin with an expanded Q repeat.

Real Time RT-PCR of TGF- β 1 mRNA analysis in murine astrocytes (A) and human glial cells (B) transfected with exon-1 of human huntingtin (htt) containing an expanded 72Q repeat or an unexpanded 25Q repeat used as a control, under basal conditions (A,B) and after treatment with LY379268, 1 μ M for 10 min (A). Values are means \pm S.E.M. of 5-6 determinations. $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in transfected astrocytes/glial cells treated with PBS (*) or vs. the respective values obtained in astrocytes/glial cells transfected with exon-1 htt 25Q (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD).

Real Time RT-PCR of TGF- β 1 mRNA analysis (C, D) in ST7/7Q, wild-type cells or full-length mutated huntingtin ST111/111Q, mhtt cells, under basal conditions and after treatment with LY379268, 1 μ M for 10 min. (E) ELISA analysis of extracellular TGF- β 1 protein wild-type and mhtt cells, under basal conditions and after treatment with LY379268, 1 μ M for 10 min. Values are means \pm S.E.M. of 5-6 determinations. $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in wild-type cells treated with LY379268 (*) or vs. the respective values obtained in ST7/7Q cells (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD). Real Time RT-PCR of TGF- β 1 mRNA analysis (F) in ST7/7Q and ST111/111Q knock-in cells transfected with the unexpanded exon-1 htt 25Q or the expanded exon-1 htt 72Q. Values are means \pm S.E.M. of 5-6 determinations. $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in ST7/7Q cells transfected with exon-1 htt 25Q (One-way ANOVA + Fisher's PLSD).

Figura 6 – Analisi del TGF- β 1 in sistemi in vitro murini (astrociti e neuroni) e umani (cellule gliali) esprimenti l'mhtt.

Analisi del mRNA del TGF- β 1 negli astrociti murini (A) e cellule gliali (B) transfettate con esone-1 dell' huntingtina umana (htt) contenente una ripetizione di 72Q o una di 25Q utilizzato come controllo, in condizioni basali (A, B) e dopo il trattamento con 1 μ M per 10 min di LY379268 (A). I valori sono stati calcolati su una media \pm S.E.M. di 6 determinazioni. $P < 0.05$ vs i rispettivi valori ottenuti negli astrociti transfettati / glial cellule trattate con PBS (*) o contro i rispettivi valori ottenuti negli astrociti / cellule gliali trasfettate con esone-1 25Q (#) (One-way ANOVA PLSD Fisher

). Analisi di Real Time RT-PCR sui livelli di TGF- β 1 (C, D) in ST7/7Q (cellule wild-type) o ST111/111Q (cellule mutate), in condizioni basali e dopo trattamento con LY379268, 1 μ M per 10 min. Analisi ELISA della proteina TGF- β 1 extracellulare (E) in cellule wild-type e cellule mhtt, in condizioni basali e dopo trattamento con LY379268, 1 μ M per 10 min. $P < 0.05$ vs i rispettivi valori ottenuti in cellule wild-type trattate con LY379268 (*) o contro i rispettivi valori ottenuti in cellule ST7/7Q (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD). 1 Analisi dell mRNA per Real Time RT-PCR (F) in cellule knock-in ST7/7Q e ST111/111Q trasfettate con l'esone-1 25Q o l'esone-1 72Q. I valori sono stati calcolati su una media \pm S.E.M. di 6 determinazioni. $P < 0.05$ vs i rispettivi valori ottenuti in cellule trasfettate con ST7/7Q esone-1 25Q (One-way ANOVA + Fisher's PLSD).

Figure 7 – Analysis of GLUT-1 and GLUT-3 in striatal-derived knock-in cells expressing full-length huntingtin with an expanded Q repeat and human glial cells expressing exon-1 htt 72Q.

Real Time RT-PCR of GLUT-1 (A) and GLUT-3 (B) mRNA analysis in ST7/7Q, wild-type cells or full-length mutated huntingtin ST111/111Q, mhht cells. Real Time RT-PCR of GLUT-1 (C) and GLUT-3 (D) mRNA analysis in human glial cells transfected with exon-1 of human huntingtin (htt) containing an expanded 72Q repeat or an unexpanded 25Q repeat. Values are means \pm S.E.M. of 5-6 determinations. $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in ST7/7Q cells or glial cells transfected with exon-1 htt 25Q (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD).

Figura 7 - Analisi di GLUT-1 e GLUT-3 in cellule striatali knock-in e cellule gliali esprimenti l'huntingtina espansa.

Analisi di Real Time RT-PCR di GLUT-1 (A) e GLUT-3 (B) in ST7/7Q (cellule wild-type) o ST111/111Q (cellule mutate). Real Time RT-PCR di GLUT-1 (C) e GLUT-3 (D) nelle cellule gliali umane trasfettate con esone-1 umano che contiene un ripetizione di 72Q o 25Q. I valori sono stati calcolati su una media \pm S.E.M. di 6 determinazioni. $P < 0.05$ vs i rispettivi valori ottenuti in cellule ST7/7Q o cellule gliali trasfettate con esone-1 25Q (#) (ANOVA + Fisher PLSD).

Figure 8 – Effects of TGF- β 1 treatment on GLUT-1 mRNA expression and cell viability in striatal-derived knock-in cells expressing full-length huntingtin with an expanded Q repeat

Real Time RT-PCR of GLUT-1 mRNA analysis (A) in striatal-derived knock-in cells treated with 2,5 ng/ml of TGF- β 1 for 12 hours. Values are means \pm S.E.M. of 5-6 determinations. $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in untreated ST7/7Q (*) and untreated ST111/111Q (**). (One-way ANOVA + Fisher's PLSD). Percentage of apoptotic (B) or necrotic (C) cells under basal condition and after treatment with 2,5 ng/ml TGF- β 1 for 12 hours. P Values are means \pm S.E.M. of 5-6 determinations. $P < 0.05$ vs. the respective values obtained in ST111/111Q cells or glial cells transfected with exon-1 htt 25Q (#) (One-way ANOVA + Fisher's PLSD).

Figura 8 - Effetti del trattamento con TGF- β 1 sull'espressione dell' mRNA di GLUT-1 e la vitalità delle cellule striatali knock-in esprimenti l'huntingtina espansa

Real Time RT-PCR di GLUT-1 (A) in cellule striatali derivati knock-in trattate con 2,5 ng / ml di TGF- β 1 per 12 ore. I valori sono stati calcolati su una media + S.E.M. di 6 determinazioni. $P < 0.05$ vs i rispettivi valori ottenuti in ST7/7Q non trattati (*) e ST111/111Q non trattate (**). (One-way ANOVA + Fisher's PLSD). Percentuale di apoptosi (B) o necrosi (C) delle cellule in condizioni basali o dopo trattamento con 2,5 ng / ml di TGF- β 1 per 12 ore. I valori sono stati calcolati su una media + S.E.M. di 6 determinazioni. $P < 0.05$ vs i rispettivi valori ottenuti in cellule ST111/111Q o cellule gliali transfettate con esone-1 25Q (#) (ANOVA + Fisher PLSD).

References

- Altar CA. et al. (1997).** Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*. 389:856-860.
- Aronica E. et al. (2001).** Expression of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor proteins in glioneuronal tumors from patients with intractable epilepsy: colocalization with N-methyl-D-aspartic acid receptor. *Acta Neuropatho.* 101: 383-92
- Beal MF. et al. (1986).** Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*. 321: 168-71.
- Bemelmans AP. et al. (1999).** Brain derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer. *Hum Gene Ther.* 10:2987-2997.
- Benn CL. Et al. (2008).** Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *J Neurosci.* 28:10720-33
- Boche D. et al. (2006).** TGF β 1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. *Neurobiol Dis.*22:638-50.
- Brionne TC. et al. (2003).** Loss of TGF- β 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron.* 40:1133-1145.
- Browne SE. et al., (1997).** Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41: 646–653
- Bruno V. et al. (1998).** Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is mediated by transforming growth factor- β . *J Neurosci.* 18:9594-9600.
- Björkqvist M. et al. (2006).** Progressive alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 15: 1713–1721.
- Björkqvist M. et al. (2008).** A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med.* 205: 1869-77.
- Canals JM. et al. (2004).** Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci.* 24:7727-7739.
- Cannella M et al. (2001)** Presymptomatic tests in Huntington's disease and dominant ataxias. *Neurol Sci* 22: 55-56
- Cha JH. et al. (1998).** Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human Huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6480-6485.
- Cha JH. (2007).** Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 83:228-48. Review
- Chaturvedi RK et al. (2009).** Impaired PGC-1 α function in muscle in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 18: 3048-65.
- Ciammola A. et al. (2006).** Increased apoptosis, Huntingtin inclusions and altered differentiation in muscle cell cultures from Huntington's disease subjects. *Cell Death Differ.* 13: 2068–2078
- Ciammola A. et al. (2007).** Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 144B:574-577.

- Ciarmiello A. et al. (2006).** Brain white-matter volume loss and glucose hypometabolism precede the clinical symptoms of Huntington's disease. *J Nucl Med.* 47:215-222.
- Conforti P et al. (2008)** Blood level of brain-derived neurotrophic factor mRNA is progressively reduced in rodent models of Huntington's disease: Restoration by the neuroprotective compound CEP-1347. *Mol Cell Neurosci.* 39: 1-7.
- Corti C. et al. (2007).** The use of knockout mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection. *J Neurosci.* 27:8297-8308.
- Curtis MA et al. (2003).** Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 9023-7.
- Dalrymple A. et al. (2007).** Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *J Proteome Res.* 6:2833-40.
- Datto MB et al. (1995).** Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 5545-9.
- De Groot CJ. et al. (1999).** Expression of transforming growth factor (TGF)- β 1, - β 2, and - β 3 isoforms and TGF- β type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58: 174-87.
- del Toro D. et al. (2006).** Mutant huntingtin impairs the post-Golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not its Val66Met polymorphism. *J Neurosci* 26:12748-12757.
- DeMarch Z. et al. (2008).** Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Disease* 30:375-387.
- Dennler S. et al. (2002).** Transforming growth factor β signal transduction. *J Leukoc Biol.* 71:731-40.
- De Servi et al. (2002).** Decrease of TGF- β 1 plasma levels and increase of nitric oxide synthase activity in leukocytes as potential biomarkers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 37:813-21.
- Dheen ST. et al. (2007).** Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem.* 14:1189-97. Review.
- Di Maio L et al (1993).** Onset symptoms in 510 patients with Huntington's disease. *J Med Genet* 30: 289-292
- D'Onofrio M. et al. (2001).** Neuroprotection mediated by glial group-II metabotropic glutamate receptors requires the activation of the MAP kinase and the phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J Neurochem.* 78:435-445
- Djousse L. et al. (2002).** Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology* 59: 1325–1330.
- Duan W. et al. (2003).** Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2911-2916.
- Ebert AD. et al. (2010)** Ex vivo delivery of GDNF maintains motor function and prevents neuronal loss in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp Neurol.* 224:155-62.
- Esmailzadeh M et al. (2010)** Seeking Brain Biomarkers for Preventive Therapy in Huntington Disease. *CNS Neurosci Ther.* Epub ahead of print
- Feigin A. et al., (2001).** Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: an [(18F)]FDG PET study. *J. Nucl. Med.* 42: 1591–1595

- Ferrer I et al. (2000).** Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res.* 866: 257-61.
- Finch CE. et al. (1999).** TGF- β 1 is an organizer of responses to neurodegeneration. *J Cell Biochem.* 53:314-322. Review.
- Flanders KC. et al. (1989).** Transforming growth factor- β 1: histochemical localization with antibodies to different epitopes. *J Cell Biol.* 108: 653-60.
- Flanders K.C. et al (1998).** Transforming growth factor- β s in neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiol.* 54: 71-85
- Folstein MF. Et al. (1975).** "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 2: 189-98.
- Forrest CM. et al. (2010).** Blood levels of kynurenines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease. *J Neurochem.* 112:112-22.
- Gamberino WC. and Brennan WA Jr. (1994).** Glucose transporter isoform expression in Huntington's disease brain. *J Neurochem.* 63:1392-7
- Gauthier LR. et al. (2004).** Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell.* 118:127-138.
- Gharami K. et al. (2008).** Brain-derived neurotrophic factor over-expression in the forebrain ameliorates Huntington's disease phenotypes in mice *J Neurochem.* 105:369-379.
- Grainger DJ. et al. (2000).** TGF- β in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11: 133-45.
- Gu, M. et al., (1996).** Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39: 385–389
- Heuser IJ. et al. (1991)** The limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis in Huntington's disease. *Biol. Psychiatry.* 30: 943–952.
- Houi K. et al. (2002).** Increased plasma TGF- β 1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 106:299-301
- Huntington Study Group. (1996).** The Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. Huntington Study Group. *Mov Disord.* 11: 136-42.
- Izicka J. et al. (2002).** Transforming growth factor-B 1 (tgf-B 1) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Cytokine* 20:239-243.
- Inoki K. et al. (1999).** TGF- β 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 55:1704-12.
- Jiang Y et al. (2000).** Transforming growth factor-beta 2 is anterogradely and retrogradely transported in motoneurons and up-regulated after nerve injury. *Neuroscience.* 97: 735-42.
- Kassubek J. et al. (2004).** Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* 62: 523–524.
- Katoh-Semba R. et al. (2002).** Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J.* 16: 1328-30.
- Kells AP. et al. (2004).** AAV-mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of Huntington disease. *Mol Ther.* 9:682-688.
- Kim WK. et al. (2004).** TGF- β 1 represses activation and resultant death of microglia via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Immunol.* 172:7015-7023.
- Kirkwood SC. et al. (2001)** Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease. *Arch. Neurol.* 58: 273–278.

- Kitagawa T. et al. (1991).** Transforming growth factor- β 1 stimulates glucose uptake and the expression of glucose transporter mRNA in quiescent Swiss mouse 3T3 cells. *J Biol Chem.* 266:18066-71
- Koopman G. et al. (1994).** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 84:1415-20
- Kremer HP. et al. (1990)** Atrophy of the hypothalamic lateral tuberal nucleus in Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49: 371–382.
- Kremer HP. et al. (1991).** The hypothalamic lateral tuberal nucleus and the characteristics of neuronal loss in Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* 132: 101–104.
- Kremer B et al. (1994)** A worldwide study of Huntington's disease mutation: the sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* 20: 1401-1406.
- Kriegstein K. et al. (1998).** Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor- β for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J Neurosci.* 18: 9822-34
- Kuhl DE. et al. (1982)** Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan. *Ann. Neurol.* 12: 425–434.
- Langbehn DR. et al. (2004).** A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet.* 65: 267-77.
- Leblhuber F. et al. (1995).** Serum dehydroepiandrosterone and cortisol measurements in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.* 132: 76–79
- Liévens JC. et al. (2001)** Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 8: 807–821.
- Li JY. et al. (2005).** The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx.* 2:447-64. Review.
- Lodi R et al. (2000).** Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy. *Ann Neurol.* 48:72-6
- Lu J. et al. (2005).** SMAD pathway mediation of BDNF and TGF β 2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons. *Development.* 132: 3231-3242
- Lúdvíksson BR. and Gunnlaugsdóttir B. (2003).** Transforming growth factor- β as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol.* 58:129-38. Review
- Maat-Schieman M. et al. (2007).** Neuronal intranuclear and neuropil inclusions for pathological assessment of Huntington's disease. *Brain Pathol.* 17: 31-7.
- Maglione V. et al. (2005).** Adenosine A2A receptor dysfunction correlates with age at onset anticipation in blood platelets of subjects with Huntington's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 139B:101-5.
- Maglione V. et al. (2006).** The platelet maximum number of A2A-receptor binding sites (Bmax) linearly correlates with age at onset and CAG repeat expansion in Huntington's disease patients with predominant chorea. *Neurosci. Lett.* 393: 27–30.
- Mangiarini et al. (1996).** Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell.* 87:493-506.
- Mann VM. et al. (1990).** Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease. *Lancet* 336: 749
- Marder K. et al. (2000).** Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group. *Neurology.* 54: 452-8.
- Markianos M. et al. (2005).** Plasma testosterone in male patients with Huntington's disease: relations to severity of illness and dementia. *Ann. Neurol.* 57: 520–525.

- Masumi A. et al. (1993).** Modulation of the synthesis and glycosylation of the glucose transporter protein by transforming growth factor- β 1 in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1145:227-34.
- McBride JL. et al. (2003).** Structural and functional neuroprotection in a rat model of Huntington's disease by viral gene transfer of GDNF. *Exp Neurol* 181:213-223.
- McBride JL. et al. (2006).** Viral delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor improves behavior and protects striatal neurons in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9345-9350.
- Meade CA. et al. (2002).** Cellular localization and development of neuronal intranuclear inclusions in striatal and cortical neurons in R6/2 transgenic mice. *J Comp Neurol* 449:241-269.
- Milakovic T. and Johnson GV. (2005).** Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem.* 280:30773-82.
- Mochel F. et al. (2007).** Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS ONE.* 25::2(7):e647.
- Myers RH. et al. (1991).** Factors associated with slow progression in Huntington's disease. *Arch Neurol.* 48: 800-4.
- Pavese N. et al. (2006).** Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology.* 66: 1638-43.
- Penney JB. et al. (1990)** Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Mov. Disord.* 5: 93-99.
- Perez-Navarro E. et al. (1996).** Glial cell line-derived neurotrophic factor protects striatal calbindin-immunoreactive neurons from excitotoxic damage. *Neuroscience* 75: 345-352.
- Pérez-Navarro E. et al. (1999).** Intra-striatal grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* 11:241-249.
- Petersen A. et al. (2005).** Orexin loss in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 14: 39-47.
- Pineda JR. et al. (2007).** Neuroprotection by GDNF-secreting stem cells in a Huntington's disease model: optical neuroimage tracking of brain-grafted cells. *Gene Ther.* 14:118-128.
- Prehn JH et al. (1996).** Protective effect of transforming growth factor-beta1 on beta-amyloid neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* 49: 319-28.
- Powers WJ e al. (2007)** Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:2945-9.
- Quarrell OWL et al. (2009).** Juvenile Huntington's Disease and other trinucleotide repeat disorders. *Oxford University Press.*
- Ravitz MJ et al. (1996).** Differential regulation of p27 and cyclin D1 by TGF-beta and EGF in C3H 10T1/2 mouse fibroblasts. *J Cell Physiol.* 168: 510-20.
- Rawlins M. (2010).** Huntington's disease out of the closet? *Lancet.* Epub ahead of print.
- Rosas HD et al.(2008).** Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain.* 131:1057-68
- Ross CA. (2004).** Huntington's disease: new paths to pathogenesis. *Cell.* 118: 4-7.
- Rubinsztein DC et al. (1996)** Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet.* 59:16-22.
- Saleh N. et al. (2009).** Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease. *PLoS One.* 4:e4962.

- Sanberg PR. et al. (1981)** Body weight and dietary factors in Huntington's disease patients compared with matched controls. *Med. J. Aust.* 1: 407–409
- Sapp E. et al. (2001)**. Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60: 161-72.
- Sathasivam K. et al. (1999)**. Formation of polyglutamine inclusions in non- CNS tissue. *Hum Mol Genet* 8:813– 822.
- Schober A. et al. (1999)**. Glial cell line-derived neurotrophic factor rescues target-deprived sympathetic spinal cord neurons but requires transforming growth factor- β as cofactor in vivo. *J Neurosci.* 19:2008-2015.
- Schober A. et al. (2007)**. GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF- β for its neuroprotective action. *Neurobiol Dis.* 25: 378-391.
- Schoepp DD. et al. (1999)**. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 38: 1431-76.
- Seong IS. Et al. (2005)**. HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum Mol Genet.* 14:2871-80.
- Shin JY. et al. (2005)**. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol.* 171: 1001-12.
- Shull MM. et al. (1992)**. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 359:693-9.
- Slow EJ. et al. (2003)**. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 12: 1555–1567.
- Sometani A. et al. (2001)**. Transforming growth factor- β 1 enhances expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, TrkB, in neurons cultured from rat cerebral cortex. *J Neurosci Res.* 66: 369-376
- Sortino MA. et al. (2004)**. Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on β -amyloid-induced neuronal death. *Endocrinology* 145:5080-5086.
- Spector R. (2009)**. Nutrient transport systems in brain: 40 years of progress. *J Neurochem.* 111:315-20.
- Spinney L. (2010)**. Uncovering the true prevalence of Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 9:760-1.
- Squitieri F et al. (2000a)**. Family and molecular data for a fine analysis of age at onset in Huntington disease. *Am J Med Genet* 95: 366-373
- Squitieri F et el. (2000b)** Atypical movement disorders in the early stages of Huntington's disease: clinical and genetic analysis. *Clin Genet* 58: 50-56
- Squitieri F et al. (2003)**. Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 126: 946-955
- Squitieri F. et al. (2008)**. Neuroprotective effects of riluzole in Huntington's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 35: 221-2.
- Squitieri F. et al. (2009)**. Riluzole protects Huntington disease patients from brain glucose hypometabolism and grey matter volume loss and increases production of neurotrophins. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 36:1113-20.
- Squitieri F, Ciarmiello A. (2010)** Key role of nuclear medicine in seeking biomarkers of Huntington's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 37:1124-7.
- Tai YF. et al. (2007)**. Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain.* 130: 1759-66.
- Tesseur I. et al. (2006)**. Deficiency in neuronal TGF- β signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J Clin Invest.* 116:3060-3069.
- Tesseur I. and Wyss-Coray T. (2006)**. A role for TGF- β signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models. *Curr Alzheimer Res.* 3:505-513.

- Trettel F. et al. (2000).** Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet.* 9: 2799-809.
- Ueberham U. et al. (2006).** Altered subcellular location of phosphorylated Smads in Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci.* 24:2327-2334.
- Underwood BR. et al. (2006)** Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. *Brain* 129: 877–886.
- van der Burg JM. et al. (2009).** Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 8: 765-774.
- Van Raamsdonk JM. et al. (2005b).** Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 25: 4169–4180.
- Vannucci SJ. et al. (1997).** Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia.* 21:2-21. Review
- Varani K. Et al. (2003).** Aberrant A2A receptor function in peripheral blood cells in Huntington's disease. *FASEB J.* 17: 2148–2150
- Vermes I. et al. (1995).** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184:39-51.
- Vivien D and Ali C. (2006).** Transforming growth factor- β signalling in brain disorder. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17: 121-28.
- Vonsattel JP et al. (1985).** Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 559-577
- Vonsattel, J.P. & DiFiglia, M. (1998).** Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57: 369–384.
- Wahl SM. et al. (2000).** TGF- β influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:71-9. Review
- Wexler NS. Et al. (2004).** Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3498–503.
- Wheeler VC et al.(2000).** Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 9:503-13.
- Wheeler VC et al. (2003).** Mismatch repair gene Msh2 modifies the timing of early disease in Hdh(Q111) striatum. *Hum Mol Genet* 12:273-81
- Wyss-Coray T. (2006).** Tgf-B pathway as a potential target in neurodegeneraation and Alzheimer's. *Curr Alzh Res.* 3: 191-95.
- Zuccato C. et al. (2001).** Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293:493-498.
- Zuccato C. et al. (2003).** Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE controlled neuronal genes. *Nat Genet.* 35:76-83.
- Zuccato C et al. (2005).** Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol Res.* 52: 133-9.
- Zhu Y et al. (2001).** TGF-beta1 inhibits caspase 3 activation and neuronal apoptosis in rat hippocampal cultures. *Neurochem Int.* 38: 227-35.
- Zhu Y et al. (2002).** Transforming growth factor-beta1 increases Bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci.* 22: 3898-909.
- Zhu Y et al. (2004).** Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase 1,2 signaling pathways. *Neuroscience* 123: 897-906.