

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA IN NEUROBIOLOGIA (XXII CICLO) ANNO ACCADEMICO 2009-2010

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Roberto Avola

Tutor: Chiar.mo Prof. Vittorio Calabrese

Cotutor: Chiar.mo Prof. Carlo Minetti

TESI DI DOTTORATO (Dott.ssa Eleonora Guagliano): “Modulazione della risposta cellulare allo stress ossidativo nell’invecchiamento e nelle patologie neurodegenerative”.

Abstract

Emergenti evidenze sperimentali indicano il coinvolgimento dello stress ossidativo alla base dei meccanismi patogenetici che portano al danno neuronale in diverse condizioni patologiche, inclusi i disordini neurodegenerativi, quali la malattia di Alzheimer e l’invecchiamento fisiologico (**1, 3, 8, 12, 36, 48, 66**). Le attuali evidenze suggeriscono che, in generale, la riduzione dell’espressione cellulare e dell’attività di proteine antiossidanti associata ad una diminuzione nell’efficienza dei meccanismi cellulari di riparazione e di degradazione ed il conseguente incremento dei livelli di stress ossidativo e/o nitrosativo rappresentano una delle cause fondamentali sia dei normali processi d’invecchiamento che delle principali malattie neurodegenerative (**1, 9, 12, 34, 96, 249**). Uno dei principali sistemi redox intracellulari coinvolti nella neuroprotezione, il sistema dei *vitageni*, dato principalmente dal sistema delle proteine *Hsps*, è emerso quale potenziale neurometico *target* di innovative strategie terapeutiche citoprotettive (**15, 17-18**). I dati del presente studio sperimentale indicano l’importanza del sistema dei *vitageni* alla base della risposta cellulare allo stress e il potenziale impiego di antiossidanti nutrizionali, nella prevenzione e nel trattamento dei disordini neurodegenerativi, dell’invecchiamento e delle patologie sistemiche (**12, 17, 251**). L’emergente evidenza sperimentale in base alla quale il *network* dei *vitageni* opera quale sistema di difesa nel cervello in seguito ad aumentati livelli di stress ossidativo e/o nitrosativo apre nuove prospettive nel campo della medicina per il trattamento dei disordini neurodegenerativi e di altre patologie età-dipendenti (**2, 12, 14, 31, 249, 251**). Considerate in una visione d’insieme, i dati sperimentali del

presente studio indicano che l'espressione delle Hsps aumenta durante l'invecchiamento ed in presenza di alterazioni dello stato redox, al fine di limitare le conseguenze deleterie date dall'eccessiva produzione di proteine alterate ossidativamente **(1, 3, 5, 8, 12)**. Riguardo ciò, abbiamo rivolto il nostro interesse verso lo sviluppo di innovativi interventi nutrizionali, dati da antiossidanti presenti nella dieta, quali la carnosina, aventi come *target* tali geni citoprotettivi redox-sensitivi, definiti *vitageni*, coinvolti nella neuroprotezione e nel mantenimento dell'omeostasi e dei processi che assicurano la longevità **(2, 123, 251)**. Nel presente studio abbiamo testato, inoltre, l'ipotesi sperimentale in base alla quale la neurotossicità rappresenta un importante mediatore primario di danno nella sindrome di Menieré e ciò può essere spiegato da aumentati livelli di *biomarkers* di risposta cellulare allo stress quantificabili in campioni di sangue periferico di pazienti affetti. Di conseguenza, la ricerca di innovativi e potenti induttori del sistema dei *vitageni* apre nuove prospettive per lo sviluppo di originali strategie farmacologiche in grado di dare citoprotezione e di massimizzare i meccanismi antidegenerativi, inclusa la risposta cellulare allo stress, anche nei neuroni gangliari a spirale dell'apparato cocleovestibolare, riducendo i principali segni clinici associati alla sindrome di Menieré **(16, 18, 249, 251)**.

La Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), o neurofibromatosi classica o periferica, è uno dei più comuni disordini neurogenetici ereditari a carattere autosomico dominante. Il meccanismo molecolare che sta alla base della variabilità clinica di tale sindrome multisistemica rimane ancora non del tutto conosciuto, probabilmente per la complessità dei molteplici fattori coinvolti nella sua patofisiologia. La Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) è una condizione genetica multisistemica la quale origina da mutazioni allo stato eterozigote, inattivanti il gene *tumor suppressor* NF1, localizzato nella regione pericentromerica del cromosoma umano 17 (17q11.2). L'eterogeneità allelica delle mutazioni che interessano il gene NF1 rappresenta uno dei fattori che spiega l'eterogeneità fenotipica **(285)**. Studi clinici e sperimentali dimostrano l'esistenza di una forte componente genetica e suggeriscono il coinvolgimento di *geni modificatori* alla base della variabilità di espressione di tale disordine neurogenetico **(285)**. Il prodotto del gene NF1, la neurofibromina, è una proteina ubiquitaria citoplasmatica di 2818 residui aminoacidici, con una struttura e funzione simili a quelle delle proteine GAP (*GTPasi-activating protein*), un gruppo di proteine conservate evolutivamente. L'analisi della struttura della neurofibromina ha permesso di identificarla quale regolatore negativo della proteina Ras, una proteina chiave intracellulare coinvolta nel *signaling pathway* che regola i processi di crescita e di sopravvivenza cellulare. Significativi progressi scientifici sono stati raggiunti nell'ultima decade per quanto riguarda la comprensione dei principali meccanismi

molecolari alla base della patofisiologia di tale sindrome genetica multisistemica. L'analisi mutazionale del gene NF1 ed i test genetici vengono utilizzati quale supporto e conferma della diagnosi clinica, soprattutto in quei casi clinici che non soddisfano pienamente i *criteri* diagnostici o quando la diagnosi prenatale è richiesta. Recentemente, test molecolari sono stati resi disponibili clinicamente per la diagnosi genetica di Neurofibromatosi di tipo 1 **(188, 190)**. A causa dell'enorme grandezza e complessità del gene NF1, della mancanza di siti *hotspots* mutazionali noti, dell'estrema variabilità fenotipica e della presenza di *pseudogeni*, in genere è richiesto un protocollo *multi-step* per la diagnosi molecolare di NF1 **(150)**. In accordo ad evidenze cliniche e sperimentali, i dati riportati nel presente studio mostrano chiaramente la presenza di un ampio spettro di differenti tipi di mutazioni riscontrate in diversi casi clinici, incluse mutazioni patogenetiche *missense*, *nonsense*, piccole delezioni/inserzioni, le quali portano alla sintesi di un prodotto proteico aberrante. I dati sperimentali e clinici del presente studio indicano che il meccanismo di *splicing* nel gene NF1 è estremamente complesso **(242-243)**. Infatti, nel nostro laboratorio abbiamo identificato in diversi casi clinici delle mutazioni *missense* nel sito accettore di *splicing* o intraesoniche, nel gene NF1 allo stato eterozigote, le quali possono causare o la microdelezione *in frame* di codoni, o attivare siti criptici di *splicing* intraesonici o addirittura promuovere lo *skipping* dell'esone di interesse. In tutti questi casi si ha una profonda alterazione dei meccanismi canonici di *splicing*, la quale determina la formazione di trascritti aberranti e patogenetici **(242-243)**. Per di più, al fine di identificare ridotti riarrangiamenti del gene NF1, incluse piccole delezioni/duplicazioni, abbiamo adottato recentemente nel nostro laboratorio un nuovo protocollo diagnostico basato sull'impiego della tecnica MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), per testare tutti i casi clinici NF1 risultati negativi al sequenziamento diretto per la ricerca di mutazioni puntiformi **(180, 207)**. Il nostro studio, pertanto, amplia le conoscenze e lo spettro delle mutazioni relative al gene NF1 e sottolinea l'importanza dell'analisi genetico-molecolare alla base di una caratterizzazione diagnostica anche nel campo clinico delle Neurofibromatosi.