



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE
Indirizzo in Farmacologia di Genere
(XXIV ciclo)

Ruolo degli estrogeni nella modulazione dell'apoptosi e dell'autofagia in cellule neuronali

COORDINATORE: Prof. Eusebio Tolu

TUTORE: Prof.ssa Flavia Franconi

TESI DI DOTTORATO DI:

Dr.ssa Cristiana Barbati

Anno Accademico 2010 – 2011

INDICE

1	Introduzione	Pag.	4
1.1	Estrogeni	"	4
1.1.a	Meccanismo d'azione degli estrogeni	"	6
1.1.b	Recettori degli estrogeni nel sistema nervoso centrale	"	7
1.1.c	Espressione sulla membrana cellulare dei recettori per gli estrogeni	"	10
1.1.d	Estrogeni e neurogenesi nell'adulto	"	13
1.1.e	Ruolo degli estrogeni nella fisiopatologia delle cellule neuronali	"	14
1.2	Estrogeni ed infiammazione del sistema nervoso centrale	"	15
1.2.a	L'infiammazione	"	15
1.2.b	Estrogeni e patologie a componente infiammatoria del sistema nervoso centrale	"	16
1.2.c	La malattia di Alzheimer	"	17
1.3	Il destino cellulare: apoptosi/autofagia	"	19
2	Scopo del lavoro	"	22
3	Materiali e metodi	"	24
3.1	Colture cellulari	"	24
3.1.a	Linea cellulare SH-SY5Y	"	24
3.1.b	Neuroni di ippocampo di embrioni di ratto	"	24
3.2	Trattamenti	"	26
3.3	Analisi mediante citometria a flusso	"	27

3.3.a	Espressione di $ER\alpha$ e $ER\beta$ intracitoplasmatica e di superficie	“	28
3.3.b	Espressione di $mER\alpha$ dopo trattamento con la N-AcetilCisteina (NAC)	“	29
3.3.c	Espressione di $mER\alpha$ dopo trattamento con l'RNA interferente (RNAi)	“	30
3.3.d	Apoptosi	“	31
3.4	Analisi mediante citometria statica	“	32
3.4.a	Analisi dell'espressione di $mER\alpha$	“	32
3.4.b	Analisi del citoscheletro	“	33
3.4.c	Analisi del nucleo	“	33
3.4.d	Analisi dei vetrini	“	33
3.5	Estrazione proteica e analisi mediante Western blot	“	34
3.6	Analisi statistica	“	35
4	Risultati	“	36
4.1	Espressione dei recettori degli estrogeni mediante citometria a flusso in cellule SH-SY5Y	“	36
4.1.a	Espressione di $ER\alpha$ e $ER\beta$ intracitoplasmatica e di superficie	“	36
4.1.b	Espressione di $mER\alpha$ dopo trattamento con la NAC	“	39
4.1.c	Espressione di $mER\alpha$ dopo trattamento con l'RNAi	“	40
4.2	Meccanismo di trasduzione del segnale di $mER\alpha$	“	41
4.2.a	Analisi del “signaling” molecolare innescato da $mER\alpha$	“	41
4.3	Studio del coinvolgimento di $mER\alpha$ nel controllo del destino cellulare: apoptosi/autofagia	“	44
4.3.a	Apoptosi	“	44
4.3.b	Autofagia	“	46

4.4	Espressione dei recettori degli estrogeni mediante citometria statica su neuroni di ippocampo di embrioni di ratto	“	48
5	Discussione	“	51
6	Bibliografia	“	54

1. Introduzione

1.1. Estrogeni

Gli estrogeni sono ormoni sessuali steroidei che regolano la maturazione e l'attività funzionale di molte cellule e i loro meccanismi d'azione non sono ancora ben compresi ¹⁻³. Sono steroidi a 18 atomi di carbonio (C₁₈), contenenti 3 cicloesani (A, B, C) ed un ciclopentano (D); l'anello A è fenolico (un anello aromatico con un gruppo idrossilico sul carbonio 3) e l'anello D può avere un gruppo β-idrossilico o un chetone in posizione 17. Gli estrogeni sono sintetizzati a partire dal colesterolo; l'androstenedione o il testosterone costituiscono i loro precursori immediati. La reazione prevede l'aromatizzazione dell'anello A ed è catalizzata in 3 tappe dal complesso enzimatico monoossigenasi (aromatasi) che utilizza come co-substrati il NADPH e l'ossigeno molecolare ⁴. I precursori estrogenici vengono principalmente sintetizzati nelle ovaie, nei testicoli e nelle ghiandole surrenali. Gli estrogeni naturali più potenti nella specie umana sono il 17β-estradiolo (E2), l'estrone e l'estriolo (Fig. 1). L'anello fenolico A è la caratteristica strutturale responsabile del legame selettivo ad alta affinità ai recettori per gli estrogeni ^{5,6}.

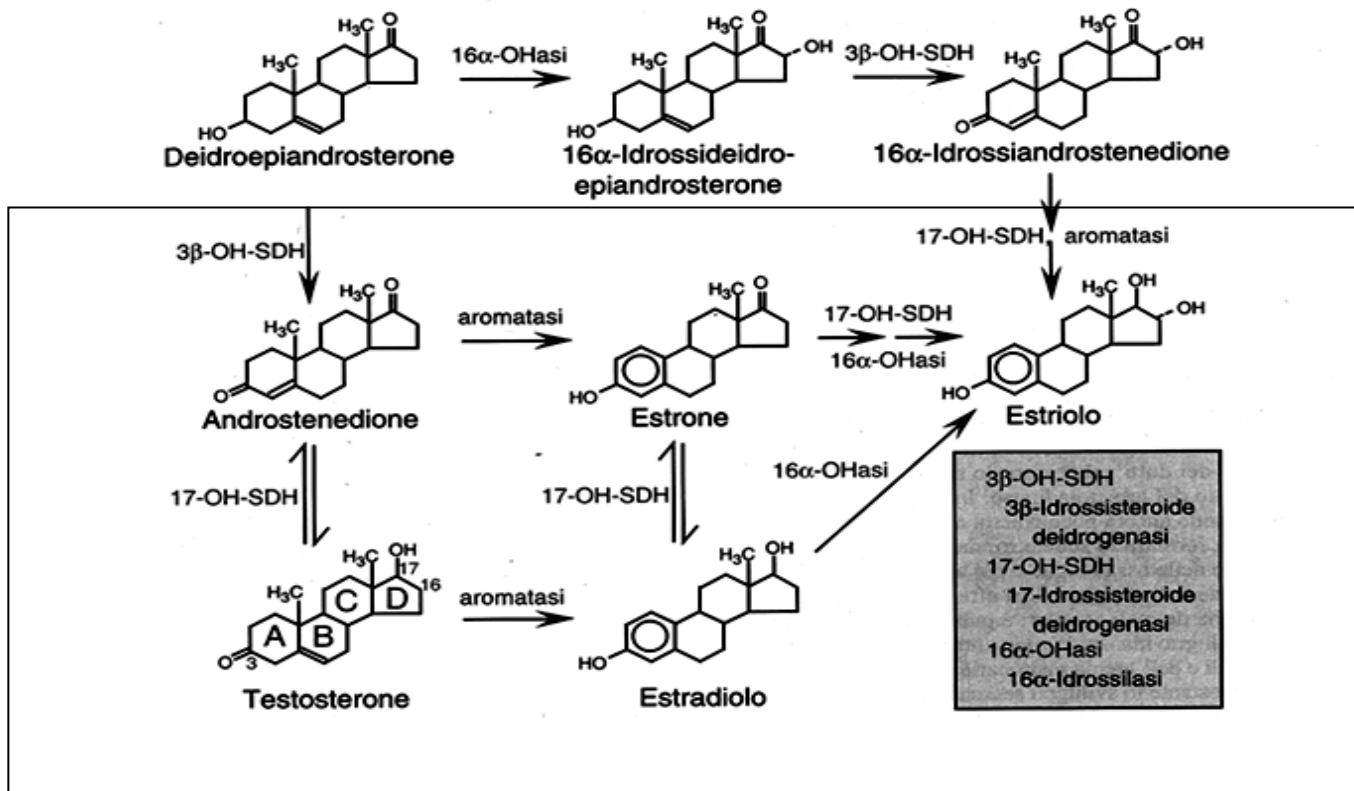


Fig. 1. La via biosintetica degli estrogeni.

La reazione di sintesi degli estrogeni dai precursori immediati (androstenedione o testosterone) coinvolge l'aromatizzazione dell'anello A ed è catalizzata in tre tappe dal complesso enzimatico monoossigenasi (aromatasi). Goodman A., (ed. 1997), McGraw-Hill

Oltre al principale ruolo nella regolazione dello sviluppo e delle funzioni nel sistema riproduttivo, gli estrogeni esplicano importanti effetti anche in altri tessuti e sistemi, essendo fattori che regolano la trascrizione genica ³. Le osservazioni riguardanti l'azione svolta dagli estrogeni sul sistema nervoso centrale, ancora risultano non chiare e in alcuni casi contraddittorie, e questo, probabilmente, a causa di numerose variabili come il tipo di estrogeno, la concentrazione ormonale ematica e/o tissutale, il legame con il recettore, l'ambiente neuroendocrino in cui avviene la reazione e le diverse metodiche utilizzate nelle analisi ⁷.

1.1.a Meccanismo d'azione degli estrogeni

Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati dal loro legame ad uno specifico recettore ("estrogen receptor" ER) intracellulare, appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione, che è presente in due isoforme, ER α (peso molecolare di 66 kDa) ed ER β (peso molecolare di 56 kDa). Entrambe le isoforme hanno una struttura conservata che consta di cinque domini: i) la regione ammino-terminale, detta "A/B domain", che è la meno conservata e che contiene un dominio detto AF-1 ("Activation Function 1"), che stimola la trascrizione dei geni bersaglio in modo indipendente dal ligando; ii) il dominio C o di legame al DNA ("DNA Binding Domain"), che è il più conservato; iii) il dominio D, una regione cerniera, che collega il dominio C al dominio E e può anche contenere sequenze di localizzazione nucleare ("Nuclear Localization Signal"); iv) la regione E che, oltre ad essere il dominio di legame del ligando ("Ligand Binding Domain", LBD), contiene un dominio per la dimerizzazione recettoriale; a livello dell'LBD è localizzato il dominio Activation Function-2, coinvolto nella trascrizione ligando-dipendente; v) la

regione carbossi-terminale F che è poco conservata ed è presente solo in alcuni recettori nucleari, tra cui entrambe le isoforme dei recettori per gli estrogeni ^{8,9}. Quando l'ormone si lega al proprio recettore, quest'ultimo dimerizza, dal citoplasma trasloca nel nucleo, e si lega a specifiche sequenze di DNA dette estrogen response elements , che sono localizzate a livello dei promotori di geni specifici, dando luogo ad effetti definiti "genomici" ¹⁰. L'attività trascrizionale dei due ER consiste nella loro capacità di reclutare coattivatori e corepressori, che regolano in maniera opposta l'assemblaggio del complesso di inizio della trascrizione ⁹. Recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di varianti di ER α a più basso peso molecolare rispetto a quella di 66 kDa ⁸. Tra queste varianti l'isoforma di 46 kDa è stata identificata in vari tipi cellulari come linee cellulari di carcinoma mammario umano (MCF-7), osteoblasti e cellule endoteliali vascolari; questo recettore, privo della regione ammino-terminale ("A/B domain"), contenente il dominio AF-1, è in grado di formare eterodimeri con l'isoforma di 66 kDa, inibendo in maniera competitiva il legame di quest'ultima al DNA ¹¹⁻¹³. Sebbene tale attività sembra essere importante nella regolazione della proliferazione cellulare, il ruolo specifico dell'isoforma di 46 kDa non è stato ancora ben chiarito.

1.1.b Recettori degli estrogeni nel sistema nervoso centrale

Numerosi studi condotti su modelli murini hanno dimostrato la presenza dei recettori degli estrogeni nel sistema nervoso centrale ¹⁴. L'ER β sembra principalmente localizzato all'interno del comparto citoplasmatico delle cellule in regioni specifiche del cervello compreso il bulbo olfattivo, la corteccia cerebrale, l'amigdala, il nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, il talamo, la *substantia nigra* e il

cervelletto ¹⁵. L'ER α invece sembra il sottotipo predominante nell'ippocampo e nella maggior parte dell'ipotalamo, mentre è scarso o assente nella corteccia cerebrale e nel cervelletto ¹⁵. Recentemente, tuttavia, aree regolate da ER sono state identificate anche nelle cellule gliali, nella microglia, e nelle cellule staminali neuronali ¹⁶. L'espressione di ER è stata osservata anche in altri tipi di cellule del sistema nervoso centrale che partecipano alle reazioni infiammatorie, cioè le cellule endoteliali e i leucociti circolanti ^{15,16}. In particolare l'ER α sembra essere principalmente coinvolto negli effetti neuroprotettivi mediati dall'E2 come è stato dimostrato in un recente studio in cui la neuroprotezione mediata dall'E2 verso l'ischemia cerebrale veniva persa in topi ovariectomizzati "knockout" per ER α , ma non in topi "knockout" per ER β ^{17,18}. Nello stesso studio, inoltre, è stato dimostrato che oligonucleotidi antisenso per ER α , ma non per ER β , attenuavano significativamente la neuroprotezione mediata dall'E2 nella regione dell'ippocampo CA1 dopo ischemia cerebrale globale (GCI) ¹⁹. La neuroprotezione da parte dell'E2 nel cervello sembra essere mediata principalmente dalla via nucleare classica ER-mediata inducendo degli effetti genomici, che coinvolge l'interazione dell'E2 con ER nucleare e la regolazione della trascrizione di vari geni che mediano la neuroprotezione. Per esempio, è stato dimostrato che l'E2 aumenta l'espressione del gene anti-apoptotico bcl-2 in seguito ad ischemia *in vivo* ²⁰. Inoltre l'E2 aumenta anche bcl-2 *in vitro* in neuroni di ippocampo di ratto ²¹ mentre inibisce l'espressione della proteina pro-apoptotica bcl-2-antagonista di morte cellulare (BAD). Inoltre è stato dimostrato che gli estrogeni riducono la traslocazione del citocromo c, così come la caspasi 3 e la frammentazione del DNA ²²⁻²⁴. L'E2 è in grado di aumentare l'espressione del fattore di sopravvivenza anti-apoptotico, survivina, dopo ischemia

dell'ippocampo, facilitando la sopravvivenza neuronale ²⁵. E' stato dimostrato che l'E2 aumenta l'espressione del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) nel cervello, che rappresenta un fattore neuroprotettivo ed è fondamentale per la plasticità sinaptica, l'apprendimento e la memoria ²⁶.

1.1.c Espressione sulla membrana cellulare dei recettori per gli estrogeni

Più recentemente è stata dimostrata la capacità degli estrogeni di indurre molto rapidamente, entro anche pochi minuti, alcune risposte cellulari, che non hanno, quindi, il tempo di poter essere mediate da proteine trascritte e sintetizzate *ex novo*, in seguito al legame con i recettori intracellulari ²⁷. Questi effetti così rapidi, mediati dagli estrogeni sono definiti “non genomici”, e sono mediati dall’attivazione di ER presenti sulla membrana plasmatica cellulare (mER). Tali recettori presentano una struttura simile a quella dei recettori intracellulari ed innescano rapidamente una cascata di trasduzione del segnale mediata da proteine chinasi come la proteina chinasi attivata da mitogeni/regolata dai segnali extracellulari (MAPK/ERK), le proteine chinasi A e C (PKA e PKC) e la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) ²⁸. Gli effetti rapidi indotti dal legame degli estrogeni con i mER possono interferire e modulare quelli “genomici” mediati dai ER intracellulari, coinvolgendo segnali sia intermedi che a valle della cascata di trasduzione del segnale ^{29,30}. Alcuni studi hanno dimostrato la localizzazione dei mER all'interno delle caveole, piccole invaginazioni della membrana plasmatica, ricche di colesterolo e sfingolipidi, e caratterizzate dalla presenza di proteine denominate caveoline, che, interagendo con le molecole della via di trasduzione del segnale, ne innescano l’attivazione. Il trasporto del recettore degli estrogeni all'interno di tali strutture è consentito dal legame tra il suo residuo di serina 522 e la caveolina-1 ³¹. In un recente studio è stato osservato che il residuo di cisteina 447, presente nella regione E dell’isoforma ER α , può subire una modificazione post-traduzionale di palmitoilazione, ossia legarsi, mediante legame tioestere, ad una unità di acido palmitico. Tale modificazione consente il legame con la caveolina-1³². Il processo di

palmitoilazione, oltre ad essere necessario per la localizzazione di ER a livello della membrana plasmatica, svolge un ruolo importante nell'induzione dei segnali rapidi di trasduzione che modulano la proliferazione cellulare, mediante le proteine chinasi ERK e PI3K ³². E' stato dimostrato che il legame di mER al proprio ligando modula la palmitoilazione di ER α e di ER β ; in particolare, in linee tumorali, la stimolazione con E2 consente, da un lato, la dissociazione di ER α dalla caveolina-1, con conseguente innesco di segnali di proliferazione cellulare, e dall'altro, aumenta l'associazione tra ER β e caveolina-1, con conseguente attivazione della proteina chinasi p38, e quindi induzione del processo apoptotico ^{33,34}. Sulla membrana plasmatica gli ER rappresentano il 5-10% del totale dei ER in vari tipi cellulari. Questa percentuale include sia ER α che ER β , ma è stata osservata una diversa espressione delle due isoforme in vari tipi cellulari. Ad esempio, nelle cellule endoteliali vascolari è stata rilevata in membrana l'espressione di entrambe le isoforme ³⁵, mentre nelle linee cellulari MCF-7 risulta essere espressa in membrana principalmente ER α e scarsamente ER β . Numerosi studi condotti su modelli murini hanno dimostrato la presenza delle due isoforme di mER nel cervello. Il rapido "signaling" non genomico attivato dai mER sembra svolgere un ruolo fondamentale nella neuroprotezione mediata dall'E2 ³⁶. Diversi laboratori hanno dimostrato che l'attivazione rapida di ERK è critica per gli effetti neuroprotettivi dell'E2, come dimostra la somministrazione di un inibitore della chinasi che è in grado di bloccare l'effetto benefico dell'E2 su cellule neuronali *in vitro* ³⁷. Inoltre l'E2 sembra svolgere la sua azione protettiva up-regolando l'attivazione della protein serin chinasi Akt in neuroni corticali *in vitro* ³⁸ e *in vivo*, in zone specifiche dell'ippocampo a seguito di ischemia ³⁹; il trattamento con un inibitore della PI3K attenua gli effetti

neuroprotettivi dell'E2 sia *in vitro* che *in vivo* ⁴⁰. Inoltre, recentemente è stato dimostrato che l'E2 attenua la rapida attivazione della chinasi proapoptotica c-Jun N-terminale chinasi nella regione dell'ippocampo CA1 dopo GCI. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che i rapidi segnali non genomici mediati dall'E2 possono giocare un ruolo critico nella neuroprotezione estrogeno-mediata ⁴⁰. Tuttavia, la maggior parte degli studi utilizzano l'E2, che è in grado di attivare i recettori degli estrogeni sia extranucleari che nucleari, dunque è difficile distinguere l'importanza e il contributo della neuroprotezione mediata dai recettori extranucleari. Per risolvere questo problema, gli studi attuali impiegano una forma di E2 coniugato all'albumina sierica bovina, l'E2BSA, che data la sua dimensione e carica non può entrare all'interno della cellula e di conseguenza non può interagire con i recettori nucleari ^{41,42}. Questo composto mantiene la capacità di indurre una rapida risposta non genomica mediata dai mER. In un recente studio è stato infatti dimostrato che la somministrazione intracerebroventricolare dell'E2BSA attiva rapidamente ERK e Akt nell'ippocampo; inoltre aumenta i livelli del fattore neurotrofico BDNF che protegge fortemente la regione CA1 dell'ippocampo contro la morte delle cellule neuronali, e migliora significativamente le funzioni cognitive ippocampo-dipendenti in seguito a GCI ⁴³. Lo studio fornisce nuove evidenze sull'importanza del ruolo rivestito dai recettori extranucleari degli estrogeni in termini di neuroprotezione. In più suggerisce che la via di trasduzione del segnale dipendente da ERK-Akt-BDNF rappresenta il meccanismo principale attraverso cui gli estrogeni esplicano la loro azione benefica nel cervello ⁴⁴.

1.1.d Estrogeni e neurogenesi nell'adulto

La neurogenesi nel cervello adulto è un fenomeno che è stato descritto recentemente. Sia l'E2 che il corticosterone possono regolare la neurogenesi nell'adulto ⁴⁵⁻⁴⁷. Il fatto che le cellule neuronali o i loro diretti precursori possano dividersi è stato un argomento molto controverso e discusso per anni in neurobiologia. Joseph Altman per primo, in seguito a studi di autoradiografia e all'utilizzo della timidina triziata, ipotizzò che nel cervello adulto alcune cellule in divisione fossero in grado di differenziarsi in cellule con una morfologia simile ai neuroni ⁴⁸. Attualmente è universalmente dimostrato che la neurogenesi nell'adulto avviene in molte specie di mammiferi, incluso l'uomo, in due aree principali: la zona subventricolare del ventricolo laterale e la zona subgranulare del giro dentato dell'ippocampo ^{49,50}. Studi recenti hanno messo in evidenza una stretta correlazione tra le funzioni di alcuni steroidi neuroattivi durante il ciclo estrale e la neurogenesi ^{51,52}. Per esempio alti livelli di E2 sono correlati positivamente con la proliferazione cellulare e negativamente correlati con la morte cellulare ⁴⁹. Le femmine di ratto adulto hanno circa il 50% in più di nuove cellule e poche cellule picnotiche nel giro dentato dell'ippocampo durante il proestro, in cui i livelli di E2 sono molto alti, rispetto agli animali in diestro ed estro quando i livelli di E2 sono molto bassi ⁴⁹. E' importante precisare che l'aumento della neurogenesi osservato durante il proestro è transitorio; non ci sono differenze nella sopravvivenza cellulare nelle femmine trattate con bromodeossiuridina (BrdU) nelle diverse fasi del ciclo estrale. Sembra quindi ormai chiaro che gli estrogeni abbiano un ruolo importante nel modulare la neurogenesi e la sopravvivenza cellulare nel cervello.

1.1.e Ruolo degli estrogeni nella fisiopatologia delle cellule neuronali

Numerosi studi clinici e sperimentali indicano che l'E2 influenza l'attività del sistema nervoso centrale mediante la modulazione dei processi cognitivi della postura, del movimento fine, dell'umore e dell'affettività ⁵³. Inoltre l'E2 esercita un'azione protettiva contro la neurodegenerazione e gli insulti al cervello, effetti che possono spiegare l'azione benefica dell'ormone sulle capacità cognitive, sulla mobilità e sulla sfera affettiva ⁵⁴. Sono state avanzate molte ipotesi per spiegare il meccanismo dell'azione neuroprotettiva degli estrogeni. E' stato osservato che l'E2 stimola la crescita dei neuriti, la differenziazione, la formazione di sinapsi. L'ormone inoltre modula la sintesi di fattori di crescita come "Nervous Growth Factor", "Insuline-like Growth Factor", "Transforming growth factor beta" ed i relativi recettori. Durante la maturazione del sistema nervoso centrale, l'attività dell'E2 continua ed assicura che i neuroni mantengano le connessioni sinaptiche indispensabili per la sopravvivenza neurale. L'E2 inoltre concorre alla regolazione positiva della sintesi di proteine che proteggono il neurone dall'apoptosi. Questa azione dell'ormone si esplica, molto probabilmente, attraverso l'attivazione della sintesi di proteine anti-apoptotiche, come Bcl-2 e Bcl-XL, e l'inibizione dell'espressione di proteine pro-apoptotiche come BNIP2 ⁵⁵. L'E2 è in grado anche di indurre la proliferazione delle cellule staminali per sostituire i neuroni che sono degenerati e può influenzare la risposta infiammatoria controllando la reattività della microglia e la funzionalità vascolare

^{56,57}

1.2.Estrogeni ed infiammazione del sistema nervoso centrale

1.2.a L'infiammazione

L'infiammazione è un processo dinamico che comprende l'insieme delle modificazioni reattive che compaiono nelle strutture vascolari e connettivali di un distretto organico, per arginare e riparare i danni prodotti da agenti lesivi di diversa natura. I classici segni clinici dell'infiammazione sono *rubor, calor, tumor, dolor et functio laesa* (rossore, calore, gonfiore, dolore e perdita di funzione)⁵⁸. Nonostante l'infiammazione sia un processo localizzato viene coinvolto l'organismo nel suo insieme. Anch'esso risponde agli stimoli flogogeni, sia con modificazioni neuro-ormonali, sia con l'attivazione del sistema linforeticolare, che comporta un'esaltazione della fagocitosi ed un aumento della produzione di anticorpi. Sebbene nella maggior parte dei casi l'infiammazione svolga un compito difensivo, in alcuni casi la reazione difensiva supera largamente le necessità locali di risposta agli insulti, e produce essa stessa un danno. Si può parlare di due tipi di infiammazione: acuta e cronica. L'infiammazione acuta è di breve durata: minuti, ore o al massimo pochi giorni. E' caratterizzata da alterazioni vascolari che causano un aumento del flusso sanguigno, da edema e da migrazione dei leucociti, soprattutto dei neutrofili provenienti dalla microcircolazione e dal loro accumulo nella regione del danno⁵⁹. L'infiammazione cronica è un'infiammazione di lunga durata in cui i processi infiammatori, il danno tissutale ed i tentativi di riparo avvengono contemporaneamente⁶⁰. E' determinata dalla persistenza di uno stimolo infiammatorio. Le cause possono essere diverse, ad esempio la prolungata esposizione ad un agente tossico, una malattia autoimmune o l'invecchiamento. E'

caratterizzata dall'infiltrazione di cellule mononucleate (macrofagi, linfociti e plasmacellule), dalla contemporanea presenza di danno tissutale, angiogenesi e fibrosi.

1.2.b Estrogeni e patologie a componente infiammatoria del sistema nervoso centrale

Effetti anti-infiammatori degli estrogeni sono stati descritti in diverse condizioni patologiche dell'uomo, in modelli animali di malattie umane ed in sistemi cellulari. Numerosi studi mostrano che gli estrogeni hanno un effetto protettivo contro malattie con una componente infiammatoria ritardandone l'insorgenza e/o attenuandone i sintomi. Tra le malattie a componente infiammatoria su cui gli estrogeni hanno azione ricordiamo l'ischemia cerebrale e il morbo di Alzheimer (Alzheimer's Disease AD)⁶¹. Una serie di studi ha dimostrato che le donne sono maggiormente "protette" contro l'ischemia cerebrale rispetto agli uomini, almeno fino agli anni della menopausa, quando i livelli di E2 diminuiscono. Sorprendentemente, diversi studi hanno dimostrato che le donne in post menopausa sono invece maggiormente esposte al rischio di ischemia cerebrale rispetto agli uomini della stessa età, con una maggiore disabilità e un più elevato tasso di mortalità^{62,63}. Anche l'AD ha una maggiore incidenza nelle donne in post-menopausa, a riprova del fatto che gli estrogeni proteggono dall'insorgenza della malattia, infatti la terapia ormonale sostitutiva sembra attenuare e ritardare alcuni sintomi della malattia, sebbene esistano teorie discordanti a riguardo⁶⁴.

1.2.c La malattia di Alzheimer

L'AD è la più comune forma di demenza ed è responsabile di circa il 50-70% dei casi di demenza. L'insorgenza dell'AD avviene generalmente in tarda età, ma esistono casi ad insorgenza precoce collegati a mutazioni del gene del precursore della proteina amiloide (Amyloid Precursor Protein, APP), della presenilina 1 e della presenilina 2⁶⁵. Questa malattia è caratterizzata clinicamente da una progressiva ed inesorabile alterazione della memoria e delle funzioni cognitive, e patologicamente dalla presenza di un gran numero di placche neuritiche e di matasse neurofibrillari. Le placche neuritiche sono grosse lesioni costituite da depositi di un peptide di 40-42/43 aminoacidi chiamato peptide β -amiloide ($A\beta$), derivante dall'APP. Le matasse neurofibrillari sono lesioni intracellulari costituite da filamenti intrecciati della proteina tau del citoscheletro. L'APP è una proteina con un singolo dominio transmembrana, metabolizzata tramite due diverse vie in tutte le cellule. In un caso l'APP è tagliato nel dominio $A\beta$, da parte di un enzima denominato α -secretasi. La seconda via comporta un taglio tra gli aminoacidi 671 e 672 dell'APP, da parte di un enzima denominato β -secretasi. Questo frammento è ulteriormente tagliato dalla γ -secretasi. A seconda della posizione del taglio viene generato un $A\beta$ di 40 o di 42/43 aminoacidi. $A\beta$ 1-42/43 si aggrega facilmente e forma i depositi di β -amiloide⁶⁶. Studi d'immunoistochimica *post-mortem* hanno rivelato che nell'AD è presente uno stato d'infiammazione cronica limitato alle aree del cervello lesionate. La microglia attivata circonda i depositi extracellulari insolubili delle placche e produce numerosi mediatori dell'infiammazione. Citochine come IL-1, IL-6 e $TNF\alpha$ e i recettori delle chemochine CC-R3 e CC-R5, prodotti dalla microglia attivata associata alle placche, aumentano nell'AD. La microglia attivata

secerne anche proteasi come ad esempio la metalloproteasi 9 (MMP-9)⁶⁷. Inoltre l'A β agisce come attivatore del complemento. L'infiammazione cronica quindi contribuisce ulteriormente al danno neuronale e alla progressione dell'AD. Molti studi epidemiologici ed alcuni studi clinici mostrano infatti che i farmaci anti-infiammatori non steroidei riducono il rischio e rallentano la progressione della malattia. Diversi studi mostrano come l'E2 ha un effetto protettivo contro l'AD⁶⁸. Esistono forti prove che la terapia sostitutiva a base di estrogeni riduce il rischio, ritarda l'insorgenza e attenua i sintomi della malattia di AD. Studi effettuati su modelli animali confermano gli effetti protettivi degli estrogeni. Ad esempio in un recente studio è stato riportato che femmine di porcellino d'India ovariectomizzate accumulavano maggiori quantità di peptide β -amiloide e una condizione fisiologica veniva ristabilita mediante somministrazione dell'E2. La privazione di estrogeni inoltre aumenta la formazione delle placche amiloidi in topi transgenici utilizzati come modello per l'AD. Le femmine sviluppano placche a circa un anno d'età. Giovani femmine ovariectomizzate mostrano livelli più elevati di A β solubile e accumulato nella placca rispetto alle femmine non ovariectomizzate. Inoltre il trattamento con E2 annulla questi effetti⁶⁹. Il meccanismo attraverso cui l'E2 esercita la sua azione protettiva nell'AD non è ancora chiaro. In diversi studi è stato dimostrato che gli estrogeni possono proteggere i neuroni contro la tossicità indotta dall'accumulo di β -amiloide⁷⁰, dallo stress ossidativo⁷¹ e da ex-citotossicità⁷². Inoltre sembra che l'E2 è capace di indurre la defosforilazione della proteina tau e prevenire la sua iperfosforilazione nei neuroni. Questi effetti insieme a quelli molecolari sopra descritti possono spiegare l'azione protettiva dell'E2 nell'AD⁷³.

1.3. Il destino cellulare: apoptosi/autofagia

L'apoptosi e l'autofagia sono fenomeni cellulari chiave di molte patologie neurodegenerative. Lo sviluppo degli organismi pluricellulari richiede un giusto equilibrio tra divisione, differenziamento, sopravvivenza/invecchiamento e morte cellulare. La regolazione di questi programmi cellulari permette la formazione di specifiche strutture ed assicura la giusta dimensione degli organi. La morte cellulare inoltre riveste un ruolo fondamentale nel mantenimento nell'omeostasi tissutale. In base a criteri morfologici sono stati descritti tre maggiori tipi di morte cellulare ⁷⁴:

- 1) apoptosi: caratterizzata dalla condensazione della cromatina, dalla coartazione della cellula e dalla frammentazione del nucleo e del citoplasma;
- 2) autofagia: caratterizzata dall'assenza di condensazione cromatinica e dalla formazione di vacuoli autofagici all'interno della cellula;
- 3) necrosi: caratterizzata dalla rottura della membrana plasmatica, dalla dilatazione degli organelli citoplasmatici e da una moderata condensazione della cromatina.

L'apoptosi e la morte per autofagia rappresentano un tipo di morte cellulare fisiologica, regolata da un programma genetico; la necrosi, invece, è una morte accidentale, non fisiologica, generalmente causata da traumi o eccessive condizioni di stress. L'apoptosi è un evento rapido, tale da prevenire una risposta infiammatoria potenzialmente dannosa; culmina nella formazione dei cosiddetti corpi apoptotici ed alla loro fagocitosi. E' finemente regolata da due differenti vie biochimiche: la via estrinseca controllata dai recettori di morte appartenenti alla famiglia dei recettori TNF, e la via intrinseca che passa per il mitocondrio. In entrambe le vie, le caspasi e le proteine della famiglia Bcl-2 giocano un ruolo fondamentale ⁷⁵. L'autofagia è un processo dinamico che la cellula adotta in

condizioni di stress quali, ad esempio mancanza di nutrienti (“starvation”) o la carenza di ossigeno (ipossia). Il “pathway” catabolico avviene ad opera dei lisosomi in seguito alla loro fusione con gli autofagosomi, vescicole a doppia membrana, che racchiudono il materiale citoplasmatico da degradare e riciclare ⁷⁶. Numerosi lavori hanno dimostrato che l’induzione di autofagia è sotto il controllo di geni appartenenti alla famiglia degli ATG. Nei mammiferi sono coinvolti almeno 16 geni, studiati in modo dettagliato nei lieviti ⁷⁷. Tra i prodotti di questi geni vi è l’LC3, specifico marcatore dei vacuoli autofagici/autofagosomici, che rappresenta l’omologo nei mammiferi di Atg8 nei lieviti. LC3 è inizialmente sintetizzato in una forma non processata, pro-LC3, che è convertita dopo taglio proteolitico a livello di una arginina localizzata nella regione C-terminale, in LC3-I, e poi in LC3-II, forma coniugata con la fosfatidiletanolamina (PE). PE/LC3 rappresenta il solo marcatore proteico certo associato all’autofagosoma ⁷⁸. Il fine del processo autofagico può essere la sopravvivenza della cellula o la morte cellulare per autofagia ⁷⁹. Infatti, in condizioni di stress la cellula attiva il macchinario autofagico per adattarsi e sopravvivere, o morire; inoltre si osserva spesso in condizioni patologiche, quali malattie neurodegenerative, miopatie ereditarie e tumori. Negli ultimi anni l’attenzione della ricerca si è focalizzata su questi due meccanismi di morte cellulare (apoptosi/autofagia), che rappresentano potenzialmente gli obiettivi per la messa a punto di strategie terapeutiche volte a manipolare i processi di morte o sopravvivenza cellulare. E’ stato riportato che, in neuroni di ippocampo di ratto, l’E2 aumenta l’espressione di bcl2 e inibisce l’espressione della molecola pro-apoptotica BAD (un antagonista di Bcl2) ⁸⁰. Inoltre è stato suggerito che E2 attivi un segnale non genomico mediato da Akt-CREB-BDNF che gioca un ruolo neuroprotettivo,

rallentando la morte cellulare per apoptosi ⁸¹. Inoltre il rapporto tra i livelli di espressione dei recettori ER α e ER β degli estrogeni sembra giocare un ruolo chiave. Infatti una diminuzione del rapporto ER α /ER β potrebbe condurre ad una rapida fosforilazione della p38 MAPK che a sua volta fosforila il soppressore tumorale p53 accelerando il processo di apoptosi ⁸². Per questo, un aumento dell'espressione di ER α è stato considerato come protettivo. Inoltre, un'altra considerazione in questo complesso scenario è rappresentata dal possibile ruolo dell'autofagia come meccanismo citoprotettivo. Recenti studi dimostrano un ruolo protettivo dell'autofagia nei neuroni e nelle malattie neurodegenerative. Un'attivazione inappropriata o prolungata dell'autofagia può determinare la morte della cellula, rendendo quindi fondamentale uno stretto controllo di questo meccanismo. Un difetto di regolazione dell'autofagia è stata osservato nell'AD e nel morbo di Parkinson ⁸³. Il flusso autofagico è dunque regolato in modo preciso da una complessa cascata di molecole che coinvolge anche MAPK-ERK e p38. In particolare, p38 potrebbe limitare l'attività costitutiva autofagica, riducendo la maturazione dell'autofagosoma. Contrariamente, stimoli autofagici, come lo stress metabolico, che attivano transitoriamente ERK, potrebbero rimuovere questo blocco e stimolare la maturazione dell'autofagosoma ⁸⁴.

2.Scopo del lavoro

Gli estrogeni influenzano molte funzioni fisiologiche e svolgono un ruolo importante nell'insorgenza e nel decorso delle malattie neurodegenerative come l'AD. Diversi studi dimostrano che, in particolare, l'E2 modula direttamente la funzione e lo sviluppo dei neuroni, sebbene il meccanismo tramite cui ciò avviene non è ancor ben chiaro ^{51,56}. Come descritto in precedenza, il meccanismo primario di azione dell'E2 è mediato dall'attività trascrizionale dei recettori intracellulari degli estrogeni, ER α and ER β , dando luogo ad effetti definiti "genomici" ¹⁰. Tuttavia è stato osservato che l'E2 è in grado di attivare una serie di eventi, in modo molto rapido, da pochi secondi a qualche minuto, che non potrebbero essere mediati dalla trascrizione e dalla sintesi delle proteine. Questo rapido effetto non genomico è mediato dall'attivazione dei mER ²⁷. Questi recettori sono strutturalmente simili alla loro controparte intracellulare e, dopo il legame con il ligando, attivano varie cascate di protein chinasi, incluso ERK, la p38 MAPK, la PKA, la PKC, e la PI3K. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di chiarire il ruolo dell'E2 nel determinare il destino delle cellule neuronali e la possibile implicazione di ER α o ER β nel controllare in maniera competente sia l'apoptosi che l'autofagia. In particolare gli obiettivi dello studio sono stati: 1) valutare l'espressione dei ER intracellulari e sulla membrana in cellule neuronali in condizioni fisiologiche e mimando un microambiente infiammatorio di stress ossidativo cronico (SOC); 2) studiare la capacità dell'E2 e dell'E2BSA, la forma impermeabile di E2, di attivare il "signaling" mediato dalle chinasi pERK e p38; 3) valutare il ruolo dell'E2 nel modulare l'apoptosi o l'autofagia, in condizioni fisiologiche e in condizioni di SOC. Il

conseguimento di questi obiettivi permetterà una migliore comprensione del diverso ruolo degli estrogeni in condizioni fisiologiche e in corso di malattie neurodegenerative.

3. Materiali e Metodi

3.1. Colture cellulari

Per i nostri esperimenti è stata utilizzata una linea cellulare di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, che rappresenta un modello di neuroni dopaminergici classicamente impiegato per condurre studi *in vitro* su patologie neurodegenerative; inoltre abbiamo condotto i nostri studi su neuroni primari di ippocampo derivanti da embrioni di ratto.

3.1.a Linea cellulare SH-SY5Y

La linea cellulare SH-SY5Y è un ibridoma derivante dalla fusione di cellule tumorali metastatiche midollari con cellule epiteliali. Per la crescita di tali cellule è stato utilizzato terreno di coltura completo (DMEM high, Gibco, Paisley, UK; siero fetale bovino 10%, glutammina 2 μ M, ipoxantina 100 μ M, amminopterinina 0.4 μ M, timidina 16 μ M, penicillina 1 U/ml e streptomycinina 1 μ g/ml Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.). Le cellule, tendenti a formare un monostrato, sono state incubate a 37°C ed al 5% di CO₂ e piastrate ad una concentrazione di circa 50.000 cellule/cm². Per staccare le cellule dalle “flask” si è utilizzata una soluzione allo 0.25% di tripsina-EDTA (Gibco).

3.1.b Neuroni di ippocampo di embrioni di ratto

Le colture primarie di neuroni di ippocampo sono ottenute a partire da embrioni di ratto Wistar al 18° giorno di vita intrauterina (Charles River, Italia). La ratte gravida viene anestetizzata e soppressa con CO₂ quindi gli embrioni sono prelevati mediante incisione mediale della parete addominale. Gli embrioni sono decapitati, gli encefali rimossi e trasferiti in una piastra Petri contenente una soluzione salina

bilanciata di Hank's (Hank's Balanced Salt Solution, BSS). La piastra è poi collocata sotto uno stereomicroscopio per il prelievo dell'ippocampo, che è dissezionato e liberato dalle meningi. La dissociazione dei tessuti è effettuata con tripsina allo 0,25% in BSS, privo di calcio e magnesio per 15 minuti in incubatore a 37°C al 5% di CO₂. I frammenti di tessuto sono ripetutamente lavati con BSS in modo da rimuovere la tripsina. Le cellule sono poi dissociate meccanicamente attraverso ripetuti passaggi in pipetta Pasteur utilizzando per gli ultimi passaggi una pipetta Pasteur con punta ristretta alla fiamma. Le cellule dissociate sono seminate in piastre Petri da 35 mm di diametro oppure su coprioggetti di vetro di dimensioni standard (13 mm) inseriti in piastre da 24 pozzetti, precedentemente trattati "overnight" con poli-L-lisina (0,25%). Il terreno utilizzato per la semina delle cellule è Minimum Essential Medium, contenente 10% di siero fetale di bovino, penicillina/streptomina all' 1%, glucosio 25 mM (MEM/FCS). Dopo circa 2 ore dal momento della semina neuronale, il MEM/FCS 10% è sostituito con Neurobasal Medium contenente il supplemento B-27. Questo terreno di coltura favorisce la crescita neuronale anche in assenza di condizionamento gliale; inoltre rallenta la crescita astrocitaria. Un ulteriore vantaggio di questo terreno è rappresentato dal fatto che, non contenendo siero bovino, ha una composizione chimica standardizzata e definita, eliminando le possibili interferenze nei protocolli sperimentali delle proteine presenti nei sieri animali. Per ottenere colture neuronali pure a 24 ore dalla semina viene aggiunto 5µM citosinarabioside, un analogo della citosina, in modo da inibire la crescita di cellule non neuronali (glia astrocitaria e microglia). Le colture così trattate hanno una contaminazione gliale inferiore all'1% come dimostrato mediante caratterizzazione della popolazione non neuronale

utilizzando anticorpi per “markers” specifici per gli astrociti quali l’anticorpo monoclonale anti-proteina fibrillare acida gliale .

3.2. Trattamenti

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate con E2, E2BSA ed H₂O₂ . L’E2 in polvere (Sigma-Aldrich) è stato ricostituito prima dell’uso in etanolo in modo da ottenere un concentrazione finale di 1 µM. L’E2BSA (rapporto molare E2:BSA = 30:1; Sigma-Aldrich), incapace di passare attraverso la membrana plasmatica per via dell’ingombro sterico creato dalla BSA, è stato ricostituito, subito prima degli esperimenti, in una soluzione fisiologica Hepes-NaCl (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM), in modo da ottenere una concentrazione finale di 1 µM. Entrambe le forme di E2 sono state usate ad una concentrazione finale di 10 nM che rispecchia la concentrazione fisiologica nel siero umano. In particolare l’E2 è stato lasciato nel terreno di coltura per 48 ore, in modo da consentire all’ormone di entrare all’interno della cellula e di innescare la risposta genomica mediata dai recettori intracitoplasmatici. L’E2BSA è stato invece tenuto in coltura per 30 minuti e successivamente le cellule sono state lavate e mantenute in terreno fresco, per valutare gli effetti non genomici mediati dall’estrogeno. L’H₂O₂ (Sigma-Aldrich) è stata diluita in Phosphate Buffered Saline (PBS) per ottenere una soluzione di 20mM; la soluzione madre è stata utilizzata ad una concentrazione finale di 10nM per 7 giorni per mimare il SOC⁸⁵ . Il trattamento è stato effettuato somministrando H₂O₂ da solo e in combinazione con l’E2 ed E2BSA, rispettivamente.

3.3. Analisi mediante citometria a flusso

La citofluorimetria a flusso è una tecnica utilizzata per l'analisi dei segnali di fluorescenza emessi da campioni di cellule in sospensione. Attraverso l'analisi citofluorimetrica, un'analisi multiparametrica e di elevata significatività statistica, è possibile effettuare una valutazione di tipo quantitativo e qualitativo, valutando l'intensità e l'omogeneità di espressione, di diversi parametri.

I parametri considerati nello studio di una popolazione cellulare possono essere:

- 1) parametri fisici, come volume e complessità interna;
- 2) biochimici;
- 3) funzionali, come lo stato di attivazione cellulare e quello proliferativo.

Al fine di poter condurre un'analisi citofluorimetrica corretta è indispensabile disporre di sospensioni cellulari monodisperse, che vengono aspirate e fatte fluire singolarmente in una camera di flusso dove le singole cellule sono sottoposte all'azione di un raggio emesso da una sorgente luminosa rappresentata, nel nostro caso, da un laser ad argon. In questo modo le cellule vengono eccitate ed emettono un segnale di "scatter", che permette di distinguere le diverse popolazioni cellulari in base alle loro dimensioni e al loro grado di complessità interna, ed un segnale di fluorescenza, fornito dall'autofluorescenza generata dai composti flavinici della cellula oppure dalla fluorescenza specifica derivante dal trattamento con fluorocromi.

I diversi parametri vengono espressi in unità arbitrarie dette canali. Questi ultimi sono rappresentati dai livelli discreti in cui i segnali luminosi vengono convertiti.

Poiché l'uso di unità arbitrarie comporta la relatività delle misure trovate è

necessario impiegare un controllo negativo per normalizzare il sistema. I citogrammi prodotti dall'elaborazione statistica dei dati possono essere di due tipi:

- *Istogramma monodimensionale*, ottenuto nei casi di analisi monoparametrica;
- “*Contour plot*” e “*dot plot*”, ottenuti nei casi in cui l'analisi effettuata è di tipo bidimensionale e, quindi, biparametrica.

Nei nostri studi è stato impiegato un citofluorimetro a flusso, FACSAria (BD Immunocytometry Systems, Singapore) Esso è dotato di un laser a ioni di argon raffreddato ad aria con una potenza di 15 mW con emissione ad una lunghezza d'onda di 488 nm.

3.3.a Espressione di ER α e ER β intracitoplasmatica e di superficie

Dopo 7 giorni di trattamento le cellule SH-SY5Y, sia trattate che non trattate, sono state staccate e lavate con PBS e preparate per la marcatura dei recettori degli estrogeni ER α e ER β . Per la marcatura intracitoplasmatica le cellule sono state fissate in paraformaldeide allo 0,4% per 15 minuti a temperatura ambiente; in seguito sono state permeabilizzate con Triton X-100 allo 0,1% per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente le cellule sono state lavate per tre volte con PBS ed incubate a temperatura ambiente con anticorpi primari monoclonali specifici. Per la marcatura di superficie le cellule SH-SY5Y sono state incubate a 4 °C con gli anticorpi primari monoclonali specifici. Per entrambe le marcature sono stati utilizzati anticorpi di topo anti-ER α (clone MC-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ed anti-ER β (clone 1531; Santa Cruz), entrambi diretti verso la porzione C-terminale del recettore e direttamente coniugati con fluoresceina isotiocianato (FITC; Sigma-Aldrich).

Come controllo isotipico è stato utilizzato un appropriato anticorpo murino anti-IgG_{2a} (Sigma-Aldrich). In tutte le marcature di superficie, 1 µg di anticorpo è stato utilizzato per 1X10⁶ di cellule. Dopo 1 ora di incubazione con gli anticorpi le cellule sono state lavate in PBS al 2% di siero fetale bovino ed i campioni sono stati analizzati mediante citometro a flusso. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 50.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro (BD Immunocytometry Systems).

3.3.b Espressione di mERα dopo trattamento con la N-AcetilCisteina (NAC)

La NAC è una sostanza dotata di azione antiossidante diretta, presentando un gruppo tiolico libero di zolfo idrogeno (-SH) in grado di interagire direttamente con i radicali ossidanti. La struttura della molecola le consente inoltre di attraversare facilmente le membrane cellulari. All'interno della cellula, la NAC viene deacetilata e si rende così disponibile la L-cisteina, aminoacido indispensabile per la sintesi del glutathione (GSH) cellulare. La NAC svolge un ruolo di primaria importanza per il mantenimento di adeguati livelli di GSH, contribuendo alla protezione cellulare dagli agenti dannosi che, per il progressivo impoverimento di GSH, sarebbero liberi di espletare la loro azione tossica per le cellule.

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate con la NAC, prima dell'aggiunta di H₂O₂, per prevenire lo stress ossidativo. La NAC è stata utilizzata ad una concentrazione finale di 10mM per 2 ore minuti a 37°C. Successivamente le cellule sono state lavate 3 volte in PBS ed incubate con H₂O₂. Al termine dell'esperimento le cellule sono state staccate, lavate in PBS e marcate per l'analisi dell'espressione di mERα;

l'acquisizione è stata fatta tramite citometro a flusso. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 50.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro .

3.3.c Espressione di mERα dopo trattamento con l'RNA interferente (RNAi)

L'RNAi è un meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA a doppio filamento sono in grado di interferire (e spegnere) l'espressione genica; è un processo specifico e potente portato avanti dalla cellula. Sebbene non tutti i dettagli del processo stesso siano ancora chiari, sembra che il cosiddetto macchinario dell'RNAi, una volta individuata una molecola di RNA a doppio filamento (dsRNA), sia in grado di avviare il meccanismo dell'RNAi.

1. Attraverso un enzima (chiamato Dicer), la sequenza di dsRNA è tagliata in frammenti di lunghezza minore (19-21 paia di basi).
2. Il breve frammento di dsRNA (chiamato "short interfering RNA", o siRNA) si associa ad un complesso enzimatico silenziatore della RNAi denominato RISC ("RNA-interference silencing complex").
3. Il dsRNA viene aperto, probabilmente da una elicasi: solo il filamento di RNA antisenso rimane associato a RISC, mentre il filamento senso viene degradato.
4. La RISC è ora attiva: è in grado di scansionare molti mRNA presenti nel citoplasma fino a trovarne uno complementare al frammento di RNA antisenso associato al complesso stesso.

Le cellule SH-SY5Y sono state piastrate in pozzetti da 60mm in DMEM completo ad una concentrazione di circa 50.000 cellule/cm². 48 ore prima della fine del trattamento con l'E2BSA e l'H₂O₂ le cellule sono state incubate con GeneSolution

siRNA (Qiagen Sciences Maryland, USA) specifico per l'RNA dell'ER α ad una concentrazione di 5nM, secondo il protocollo fornito dalla ditta. Come controllo sperimentale le cellule sono state trasfettate con un "nonsilencing RNA. Dopo 48 ore l'efficienza della trasfezione è stata valutata con la citofluorimetria a flusso usando un anticorpo anti-mER α . Inoltre, dopo la trasfezione le cellule sono state preparate per il Western blot per valutare l'espressione dell'LC3II.

3.3.d Apoptosi

La valutazione quantitativa dell'apoptosi è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit per la colorazione con Annessina V e Ioduro di Propidio (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. In breve le cellule alla fine dell'esperimento sono state lavate, incubate per 10 minuti con Annessina V e Ioduro di Propidio ed analizzate mediante citometro a flusso FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 10.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro. L'Annessina V si lega preferenzialmente ai fosfolipidi carichi negativamente come la fosfatidilserina, molecola che nelle cellule vitali è localizzata sullo strato interno della membrana plasmatica, mentre nella fase precoce del processo apoptotico, viene esposta sullo strato esterno della membrana. Durante l'apoptosi le cellule si colorano con l'Annessina V dopo la condensazione della cromatina ma prima della perdita della capacità della membrana plasmatica di escludere lo Ioduro di Propidio. Quindi, mediante la colorazione delle cellule con Annessina V e Ioduro di Propidio, è possibile identificare le cellule vive non apoptotiche (negative sia per Annessina V che per Ioduro di Propidio), cellule apoptotiche precoci (positive per Annessina V e negative

per Ioduro di Propidio) e cellule in apoptosi avanzata o necrotiche (positive per Annexina V e/o Ioduro di Propidio). Inoltre, per l'analisi dell'apoptosi le cellule SH-SY5Y sono state lavate ed incubate per 30 minuti a 4°C con anti-Bcl-2 coniugato con FITC (Sigma-Aldrich); come controllo isotipico è stato utilizzato l'anticorpo di topo anti-IgG₁, direttamente coniugato con FITC. I campioni sono stati quindi analizzati mediante citometro a flusso. Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il programma Cell Quest Pro .

3.4. Analisi mediante citometria statica

La citometria statica o immunofluorescenza è una tecnica di indagine condotta mediante anticorpi, diretti contro gli antigeni di cui si vuole vagliare la presenza, marcati con sostanze fluorescenti (fluorofori o fluorocromi) che rendono visibili gli eventuali immunocomplessi antigene-anticorpo osservati mediante uno strumento apposito quale il microscopio a fluorescenza . Per l'analisi in citometria statica le cellule SH-SY5Y e i neuroni primari di ippocampo di embrioni di ratto sono stati seminati su vetrini reticolari di almeno 13 mm di diametro e trattati con H₂O₂ ad una concentrazione finale di 10nM per 7 giorni per mimare il SOC. Dopo aver bloccato i siti aspecifici con 10% di siero AB diluito in tampone PBS le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente.

3.4.a Analisi dell'espressione di mER α

Per la marcatura di superficie il campione è stato incubato con un'anticorpo monoclonale di topo anti-ER α (clone MC-20; Santa Cruz Biotechnology) direttamente coniugato con FITC, per 1 ora a temperatura ambiente.

3.4.b Analisi del citoscheletro

Per la marcatura intracitoplasmatica il campione è stato permeabilizzato con Triton X-100 allo 0,1% per 5 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state lavate per tre volte con PBS e marcate con anticorpo monoclonale di topo anti- β actina (Sigma-Aldrich) coniugato con tetrametilrodamina isotiocianato, per 1 ora a temperatura ambiente.

3.4.c Analisi del nucleo

La metodica della colorazione nucleare con Hoechst-33258, che penetra attraverso la membrana plasmatica, è stata usata per valutare la morfologia nucleare, tipicamente alterata in caso di apoptosi. Le cellule SH-SY5Y sono state incubate per 15 minuti in PBS contenente 1 μ M/ml di Hoechst-33258 a 37°C. Il colorante ci fornisce una stima dei nuclei, che in caso di apoptosi sono caratterizzati da condensazione della cromatina (picnosi), frammentazione e riduzione delle dimensioni nucleari.

3.4.d Analisi dei vetrini

Dopo tre lavaggi in PBS per rimuovere l'anticorpo in eccesso, i vetrini sono stati montati con PBS-glicerolo (1:2) e osservati al microscopio a fluorescenza Olympus BX51/BX52, equipaggiato con una camera Zeiss Charge-confled device (CCD).

3.5. Estrazione proteica e analisi mediante Western blot

Il Western blot è una metodologia biochimica utilizzata per poter identificare una specifica proteina tra varie proteine presenti nel campione. La tecnica si basa sull'impiego di un anticorpo in grado di riconoscere e legare la proteina desiderata. Grazie all'amplificazione del segnale, la tecnica rende possibile l'individuazione di piccole quantità di proteine, dell'ordine delle picomoli (10^{-10} mol). Le cellule SH-SY5Y, sia non trattate, sia trattate, sono state lavate due volte con PBS freddo e quindi lisate in "RIPA buffer" (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl), addizionato con una miscela di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich). I lisati così ottenuti sono stati centrifugati per 20 minuti, a 4°C, a 14000 rpm. La concentrazione proteica dei sopranatanti è stata determinata con il saggio di Bradford "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad Laboratories, Heidemannstrasse, Munchen), secondo le istruzioni della ditta. I lisati cellulari (30µg/campione), sono stati separati su gel di poliacrilammide SDS-PAGE⁹⁴ al 10% e successivamente trasferiti elettricamente su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad Laboratories). Dopo aver saturato i siti liberi con TBS-T contenente il 5% di latte, le membrane sono state incubate per circa 18 ore a 4°C con i seguenti anticorpi antigene-specifici diluiti in Tris Buffered Saline con Tween 20 al 0,1% (TBS-T) a cui è stato aggiunto il 5% di latte:

1. anticorpo monoclonale di topo anti-LC3II (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA);
2. anticorpo monoclonale di topo anti-β actina (Sigma);
3. anticorpo policlonale di coniglio anti-pERK-1/2 (Cell Signaling Technology).
4. anticorpo monoclonale di topo anti-p38 (Cell Signaling Technology).

Dopo 3 lavaggi in TBS-T, alle membrane è stato aggiunto come anticorpo secondario un antisiero specie-specifico coniugato con la perossidasi di rafano (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). In seguito gli immunocomplessi sono stati rilevati mediante il saggio “Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate”, basato su una reazione di chemiluminescenza (Pierce, Rochford, IL, USA).

Le lastre sono state “scannerizzate” utilizzando il densitometro “Imaging Densitometer GS-700” (Bio-Rad Laboratories) e quantificate mediante il programma “MultiAnalist” (Bio-Rad Laboratories). La quantità di proteina per singolo campione è stata normalizzata in funzione della quantità di β -actina degli stessi.

3.6. Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm la deviazione standard (DS) di esperimenti indipendenti ripetuti almeno tre volte. La significatività statistica tra i diversi campioni è stata calcolata utilizzando il test t di Student ed il test U di Mann-Whitney. Un valore di p inferiore a 0.05 è stato considerato significativo. La statistica dei risultati ottenuti in citometria a flusso è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov e il valore di $D/s(n) \geq 15$ è stato considerato significativo⁹³.

4. Risultati

4.1. Espressione dei recettori degli estrogeni mediante citometria a flusso in cellule SH-SY5Y

4.1.a Espressione di ER α e ER β intracitoplasmatica e di superficie

Come descritto nell'introduzione, nel sistema nervoso centrale, l'espressione intracellulare di ER è stata dimostrata in molti lavori, mentre ad oggi l'espressione di tali recettori a livello della membrana plasmatica è oggetto di numerosi studi. È stato, quindi, nostro interesse verificarne la presenza. A tal fine, abbiamo inizialmente condotto uno studio su cellule di neuroblastoma SH-SY5Y mediante citometria a flusso, utilizzando gli anticorpi monoclonali anti-ER α ed anti-ER β , per l'analisi degli ER nucleari. I primi risultati sperimentali hanno confermato la presenza dei recettori ER α ed ER β intracellulari (Fig.2).

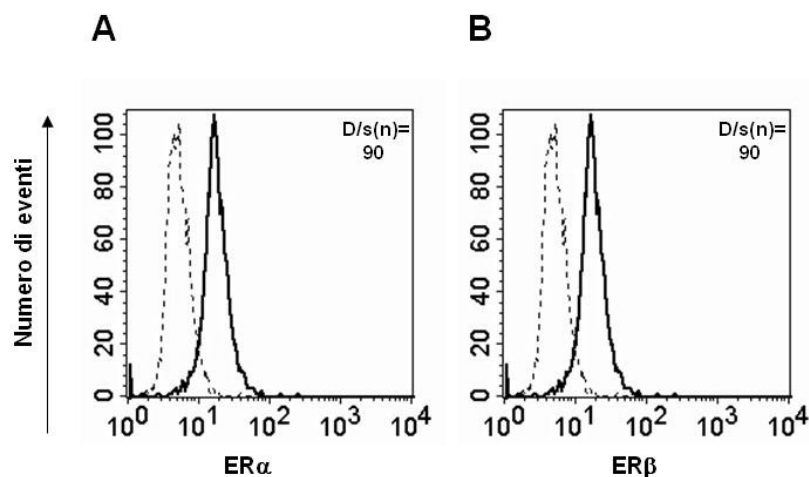


Figura. 2. Analisi dell'espressione di ER α e ER β intracitoplasmatica in cellule di neuroblastoma SH-SY5Y.

L'espressione intracitoplasmatica di ER è stata valutata mediante citometria a flusso in cellule di neuroblastoma SHSY5Y, marcate con anti-ER α (clone MC-20) ed anti ER- β (clone 1531), direttamente coniugati con FITC. L'analisi dei dati è stata effettuata sulle SHSY5Y in base ai parametri fisici "forward scatter" vs "side scatter". È mostrato, in figura, l'istogramma ottenuto da un esperimento rappresentativo di tre effettuati. Il picco di fluorescenza, che rappresenta il numero di cellule positive per ER (linea continua), mostra un significativo spostamento rispetto al controllo isotipico (linea tratteggiata) per ER α (A) e per ER β (B). La significatività statistica è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov (D/s(n) \geq 15 è significativo).

In seguito abbiamo analizzato la presenza dei mER in condizioni fisiologiche e non abbiamo osservato alcuna espressione di ER α e di ER β sulla membrana cellulare (Fig. 3 A-B). Poiché alcune tra le patologie come ad esempio l'AD presentano una condizione di stress infiammatorio cronico e poiché tale tipo di stress è essenzialmente riconducibile ad un microambiente proossidante, per riprodurre tale ambiente patologico abbiamo indotto una condizione di SOC in cellule SH-SY5Y. In questa situazione sperimentale abbiamo rilevato tramite citometria a flusso l'espressione in superficie di ER α ma non di ER β (Fig.3 C-D).

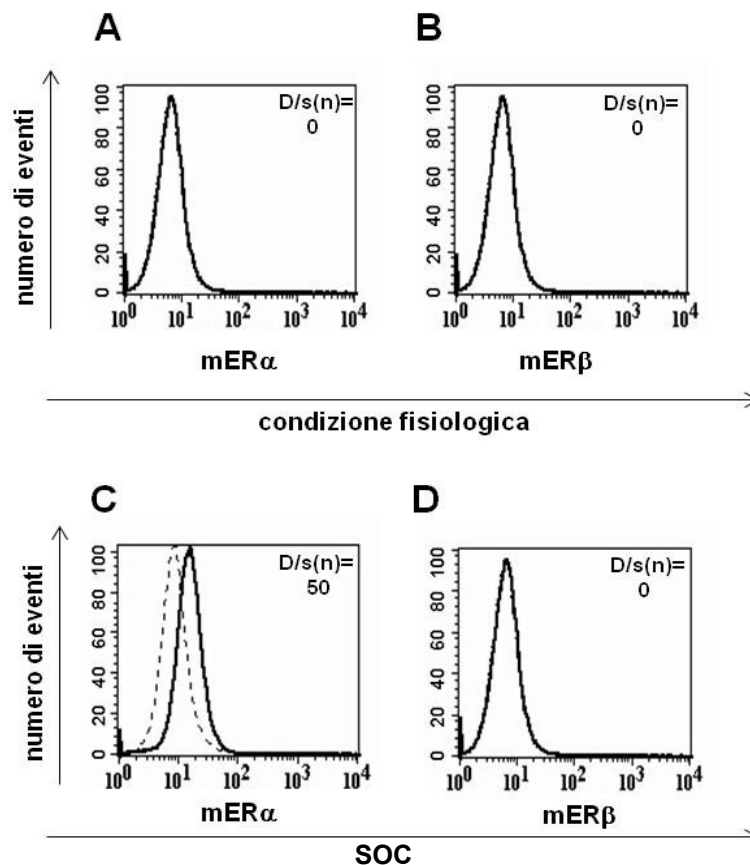


Figura.3. Analisi dell'espressione di ER α e ER β sulla membrana plasmatica di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. L'espressione di superficie di ER è stata valutata mediante citometria a flusso in cellule di neuroblastoma SHSY5Y non permeabilizzate e marcate con anti-ER α (clone MC-20) ed anti ER- β (clone 1531), direttamente coniugati con FITC. L'analisi dei dati è stata effettuata sulle SH-SY5Y in base ai parametri fisici "forward scatter" vs "side scatter". È mostrato, in figura, l'istogramma ottenuto da un esperimento rappresentativo di tre effettuati. Il picco di fluorescenza, che rappresenta il numero di cellule positive per ER (linea continua), non mostra alcun spostamento rispetto al controllo isotipico (linea tratteggiata) per ER α (A) e per ER β (B) in condizioni fisiologiche. In condizioni di SOC, invece, il picco mostra uno spostamento significativo rispetto al controllo isotipico per ER α (C) ma non per ER β (D). La significatività statistica è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov ($D/s(n) \geq 15$ è significativo).

I risultati dell'immunofluorescenza hanno confermato queste osservazioni: ER α viene espresso sulla membrana cellulare in seguito a SOC (Fig. 4 A controllo; B cellule esposte a SOC, notare la forte positività solo nell'immagine in B). E' stata altresì effettuata un'analisi delle strutture citoscheletriche, in particolare dei "network" di actina. Queste osservazioni erano motivate dalla necessità di visualizzare l'eventuale effetto citopatico dello stress cronico e la conservazione della forma cellulare. In effetti, abbiamo osservato che: i) la forma delle cellule viene essenzialmente conservata e non va incontro né ad arrotondamento né a distacco da substrato e ii) il "network" risulta moderatamente alterato ed è caratterizzato da un riarrangiamento delle fibre di F-actina che collassano in area perinucleare (Fig. 4 C, D).

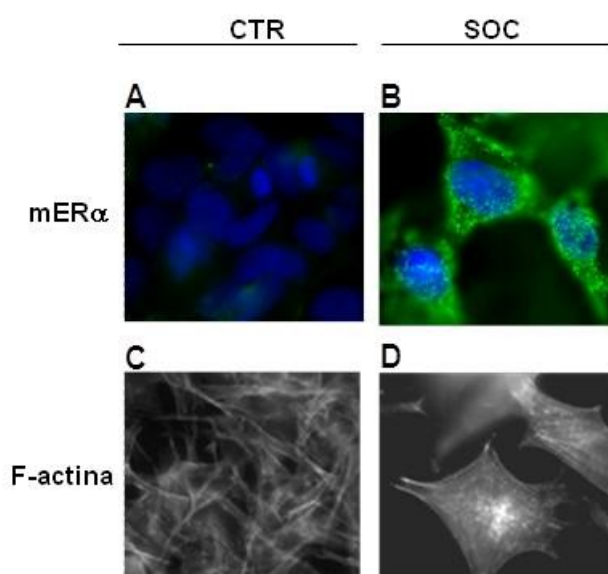


Figura.4. Analisi in fluorescenza dell'espressione di mER α di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y . Espressione di mER α in cellule di controllo (A) e in cellule in condizioni di SOC (B), Notare la positività che sostanzialmente è presente nelle sole cellule trattate (mER α in verde, nuclei in blu). La morfologia del "network" di actina come appare in cellule di controllo è mostrata in (C). A seguito di trattamento si osserva un forte riarrangiamento e redistribuzione dei filamenti mentre la forma cellulare rimane sostanzialmente inalterata (D).

4.1.b Espressione di mER α dopo trattamento con la NAC

Dopo aver valutato l'espressione di mER α in condizioni di SOC, abbiamo ipotizzato che il microambiente ossidante induceva la cellula ad esternalizzare l'ER α in superficie come meccanismo di difesa. A questo proposito abbiamo incubato le cellule SH-SY5Y in presenza di un agente antiossidante, la NAC, e successivamente abbiamo indotto SOC. Il risultato ottenuto mediante citometria a flusso ha confermato la nostra ipotesi: il trattamento con la NAC, infatti, inibiva l'espressione di mER α dopo SOC (Fig. 5).

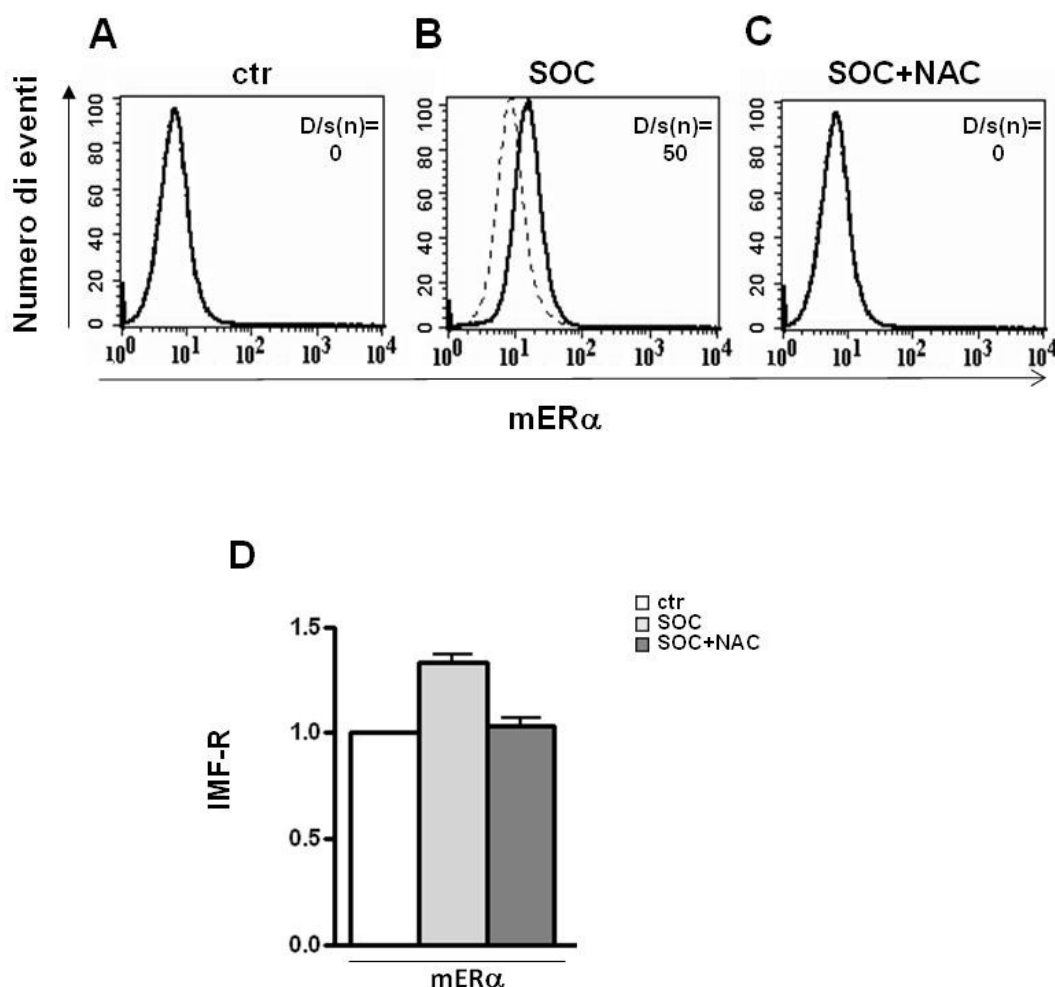


Figura.5. Analisi dell'espressione di mER α dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con la NAC. Le cellule SH-SY5Y sono state incubate in presenza di un agente antiossidante, la NAC, e successivamente stressate con H₂O₂. L'espressione di mER α è stata valutata mediante citometria a flusso marcando le cellule con anti-ER α (clone MC-20) direttamente coniugato con FITC. Le figure sono ottenute da un esperimento rappresentativo di tre effettuati, in cui l'intensità di fluorescenza dell'anticorpo anti-ER α (linea continua) è confrontata con quella del controllo isotipico (IgG umana) (linea tratteggiata). E' possibile osservare uno spostamento significativo dell'intensità di fluorescenza dell'anti-ER α rispetto al controllo isotipico nelle cellule stressate (B). Mentre il trattamento con la NAC (C) inibisce l'espressione di mER α . La significatività statistica è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov ($D/s(n) \geq 15$ è significativo). (D) Rappresentazione del rapporto tra i valori di intensità media di fluorescenza (IMF-R) ottenuti con l'anticorpo anti-ER α e quelli ottenuti con le anti IgG umane (IMF-R), in tre esperimenti indipendenti.

4.1.c Espressione di mER α dopo trattamento con l'RNAi

I risultati preliminari hanno dimostrato che le cellule SH-SY5Y non esprimono mER; dopo SOC viene esternalizzata l'isoforma α , ma non l'isoforma β di ER. Come ulteriore controllo, per verificare la specificità del fenomeno osservato, abbiamo utilizzato l'RNAi per bloccare la sintesi di ER α . Abbiamo così trattato le cellule con un RNAi per il recettore ER α e siamo andati a valutare in citofluorimetria l'espressione di mER α dopo SOC. I risultati ottenuti hanno confermato che dopo trattamento con RNAi per ER α , le cellule SH-SY5Y non esprimevano in superficie l'mER α a seguito di stress ossidativo (Fig. 6).

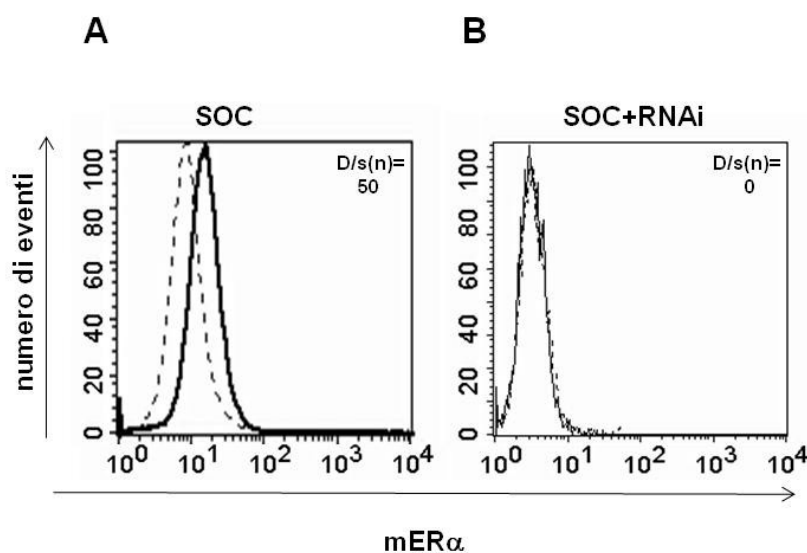


Figura.6. Analisi dell'espressione di mER α dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con l'RNAi.

Le cellule SH-SY5Y sono state trattate con un RNA interferente per il recettore ER α per bloccarne la sintesi. Siamo andati così a valutare in citofluorimetria l'espressione di mER α dopo stress ossidativo, da solo o in combinazione con RNAi. I risultati confermano uno spostamento significativo dell'intensità di fluorescenza dell'anti-ER α rispetto al controllo isotipico nelle cellule stressate (A). Mentre il trattamento con l'RNAi inibisce l'espressione di mER α (B). La significatività statistica è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov ($D/s(n) \geq 15$ è significativo).

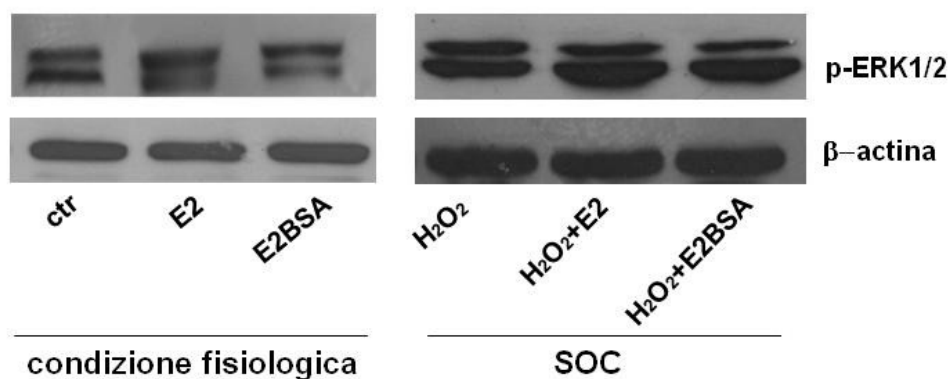
4.2 Meccanismo di trasduzione del segnale di mER α

4.2.a Analisi del “signaling” molecolare innescato di mER α

Dopo aver dimostrato la presenza dell'isoforma ER α a livello della membrana plasmatica cellulare dopo SOC, abbiamo proseguito lo studio andando a valutare la funzionalità di questo recettore.

A tale scopo abbiamo analizzato, mediante Western blot, eventi precoci della via di trasduzione del segnale, in particolare l'attivazione delle protein chinasi p-ERK1/2 e p38, in seguito al trattamento delle SH-SY5Y con E2 ed E2BSA. In condizioni fisiologiche gli estrogeni non modificavano significativamente la fosforilazione di ERK, ma in seguito a stress, gli estrogeni inducevano un significativo aumento di tale fosforilazione (Fig 7).

A



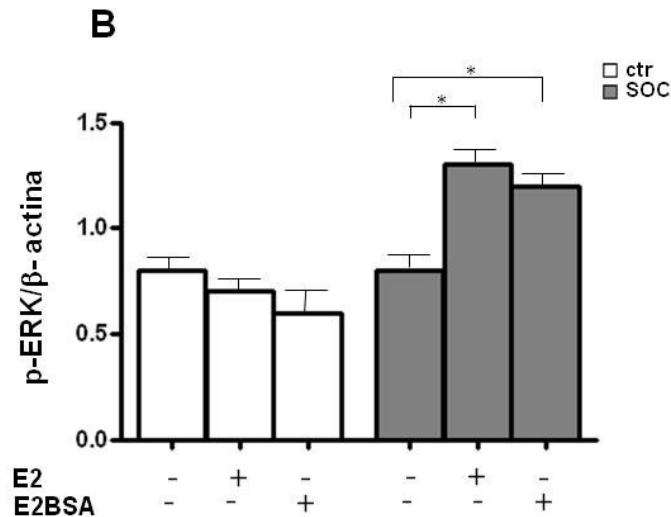


Figura 7. Analisi del “signaling” molecolare innescato da mERα: p-ERK1/2.

L'espressione della forma fosforilata della proteina chinasi ERK (pERK1/2) è stata valutata, mediante Western blot, dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con E2, E2BSA e H₂O₂. La β-actina è stata utilizzata per normalizzare le quantità proteiche caricate. (A) Esperimento rappresentativo di tre effettuati. E' possibile osservare un aumento dell'espressione di pERK1/2 nelle cellule trattate con l'E2 e l'E2BSA, dopo SOC. (B) L'istogramma mostra la media ± DS del rapporto pERK/β-actina (pERK/β-actina-R) dei valori ottenuti dall'analisi di densitometria da tre esperimenti indipendenti. *, *P* < 0.05 differenza significativa delle cellule trattate con H₂O₂ rispetto alle cellule non trattate e rispetto alle cellule trattate con H₂O₂ in presenza di E2 e E2BSA.

Questo risultato suggerisce l'espressione di un mERα funzionale che in condizioni di stress è in grado di innescare la via di trasduzione del segnale, in seguito al legame con il proprio ligando (E2, E2BSA).

Per quanto riguarda invece l'espressione di p38, osserviamo che lo stress induce un aumento significativo di questa molecola e il trattamento con estrogeni riporta il valore di p38 a livelli fisiologici (Fig. 8).

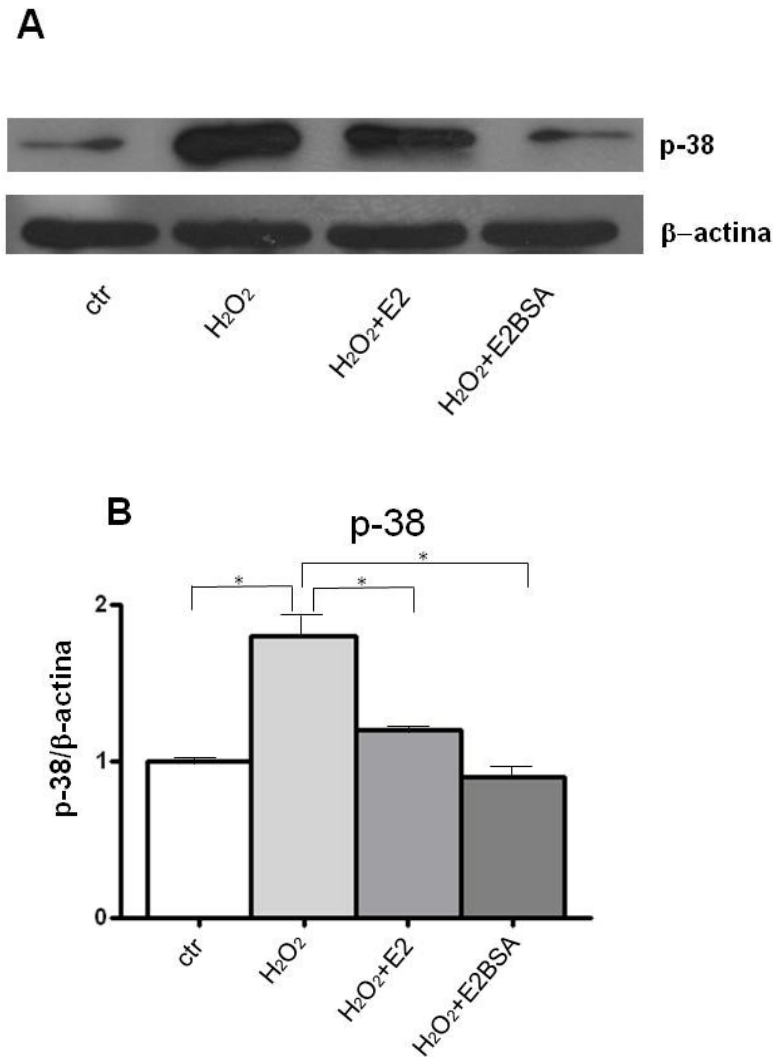


Figura 8. Analisi del signaling molecolare innescato da mER α : p-38.

L'espressione della forma fosforilata della proteina p-38 è stata valutata, mediante Western blot, dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con E2, E2BSA e H₂O₂. La β -actina è stata utilizzata per normalizzare le quantità proteiche caricate.

(A) Esperimento rappresentativo di tre effettuati. E' possibile osservare un aumento dell'espressione di p-38 nelle cellule trattate con H₂O₂; mentre il trattamento con E2 e E2BSA dopo stress ossidativo diminuisce significativamente l'espressione della proteina. (B) L'istogramma mostra la media \pm DS dei valori ottenuti dall'analisi di densitometria (rapporto p-38/ β -actina) da tre esperimenti indipendenti. *, $P < 0.05$ differenza significativa delle cellule trattate con H₂O₂ rispetto alle cellule non trattate e rispetto alle cellule trattate con H₂O₂ in presenza di E2 e E2BSA.

4.3. Studio del coinvolgimento di mER α nel controllo del destino cellulare: apoptosi/autofagia

4.3.a Apoptosi

A questo punto del nostro studio abbiamo analizzato il coinvolgimento dell'mER α nella modulazione della risposta delle cellule SH-SY5Y al SOC in termini di morte cellulare. Abbiamo quindi voluto valutare l'apoptosi.

La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata mediante una marcatura con Annexina V e Ioduro di Propidio. Abbiamo osservato che il trattamento con l'H₂O₂ induceva un aumento della percentuale di cellule apoptotiche in condizione di SOC. Interessante notare invece che in condizioni di stress cronico sia l'E2 che l'E2BSA mostravano un'azione protettiva diminuendo significativamente la percentuale di cellule in apoptosi. (Fig. 9 A-B). Inoltre, per lo studio dell'apoptosi siamo andati a studiare l'espressione della molecola anti-apoptotica Bcl2 mediante citofluorimetria a flusso. L'analisi di Bcl2 ha mostrato una diminuzione della proteina anti-apoptotica dopo SOC; il trattamento con E2 ed E2BSA riportava la situazione ad una condizione paragonabile alle cellule non sottoposte a stress (Fig.9C).

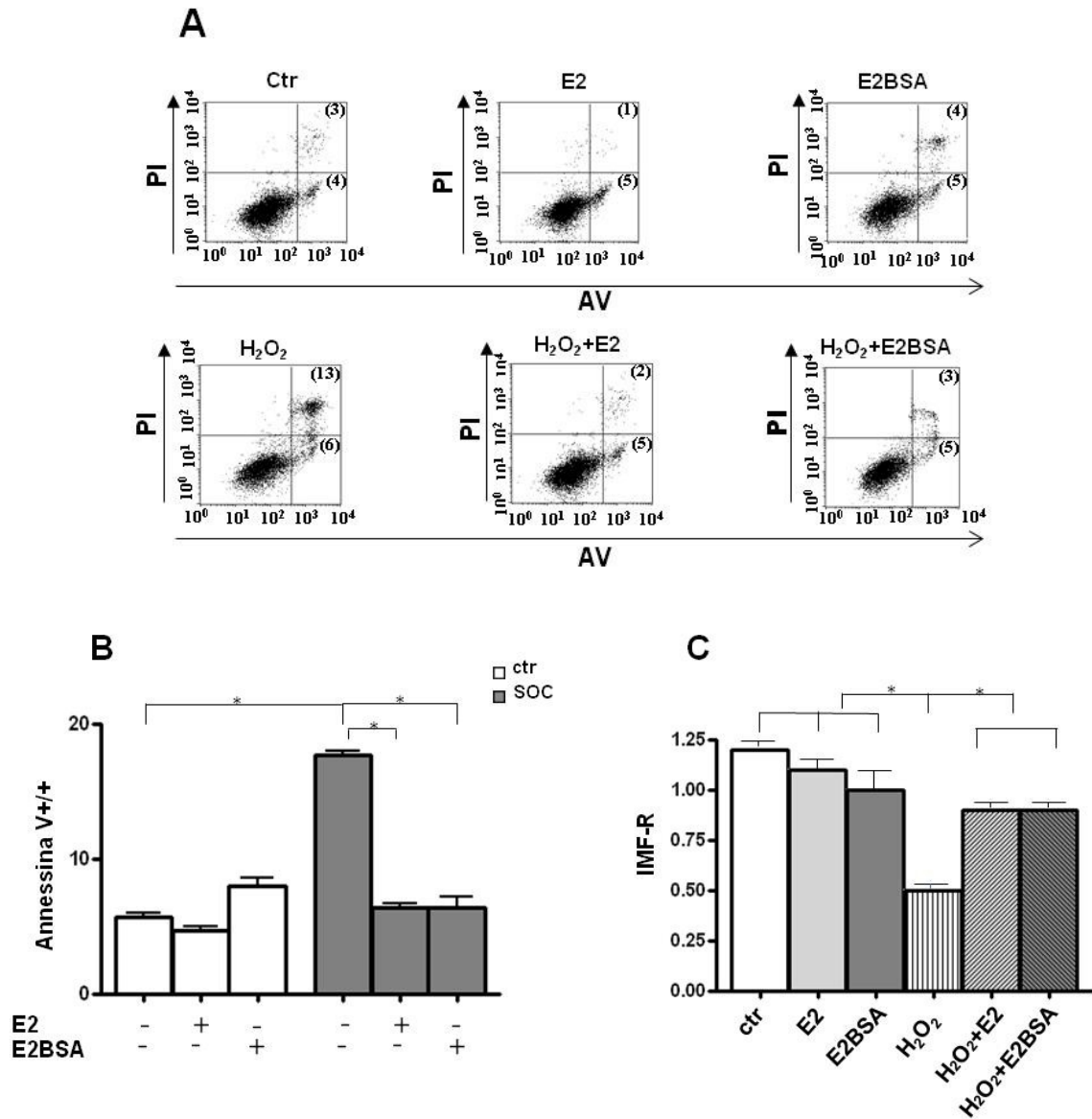
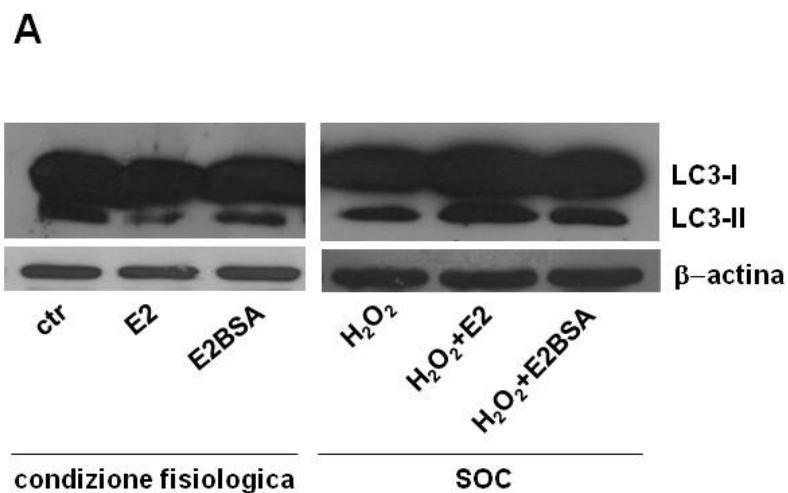


Figura 9. Analisi del coinvolgimento di mER α nel controllo del destino cellulare: apoptosi.

La percentuale di cellule apoptotiche è stata valutata in citometria a flusso mediante marcatura con Annessina V e Ioduro di Propidio. **(A)** I "dot plot" sono ottenuti da un esperimento rappresentativo, di tre effettuati, e mostrano che il trattamento con l'H₂O₂ induce un aumento della percentuale delle cellule apoptotiche, mentre sia l'E2 che l'E2BSA esercitano un'azione protettiva diminuendo significativamente la percentuale di cellule in apoptosi dopo stress ossidativo. **(B)** L'istogramma mostra la media \pm DS delle percentuali delle cellule SH-SY5Y positive all'Annessina V da tre esperimenti indipendenti. *, $P < 0.05$ differenza significativa delle cellule trattate con H₂O₂ rispetto alle cellule non trattate e rispetto alle cellule trattate con H₂O₂ in presenza di E2 e E2BSA. **(C)** Inoltre, per lo studio dell'apoptosi siamo andati a valutare l'espressione intracellulare della molecola antiapoptotica Bcl2 mediante citofluorimetria a flusso. L'istogramma mostra i valori di intensità media di fluorescenza (IMF) ottenuti con l'anticorpo anti-Bcl2 in tre esperimenti indipendenti. Lo stress ossidativo induce una diminuzione di Bcl2 e il trattamento con E2 ed E2BSA riporta la situazione ad una condizione paragonabile a quella fisiologica. *, $P < 0.05$ differenza significativa delle cellule trattate con H₂O₂ rispetto alle cellule non trattate e rispetto alle cellule trattate con H₂O₂ in presenza di E2 e E2BSA

4.3.b Autofagia

Partendo dall'ipotesi che le cellule SH-SY5Y esternalizzano l'mER α come meccanismo di difesa dopo un insulto, siamo andati a studiare uno tra i principali meccanismi che la cellula adotta per proteggersi da eventuali danni: l'autofagia. In particolare siamo andati a valutare, mediante Western blot, l'espressione di LC3II, una proteina presente sulla superficie esterna dell'autofagosoma, indice del flusso autofagico cellulare, in seguito al trattamento delle SH-SY5Y con SOC, in presenza o assenza di E2 ed E2BSA. Abbiamo osservato che gli estrogeni non modificavano significativamente il livello di autofagia nelle cellule in condizioni fisiologiche, mentre in seguito a stress erano in grado di aumentare significativamente tale fenomeno di "sopravvivenza" (Fig. 10).



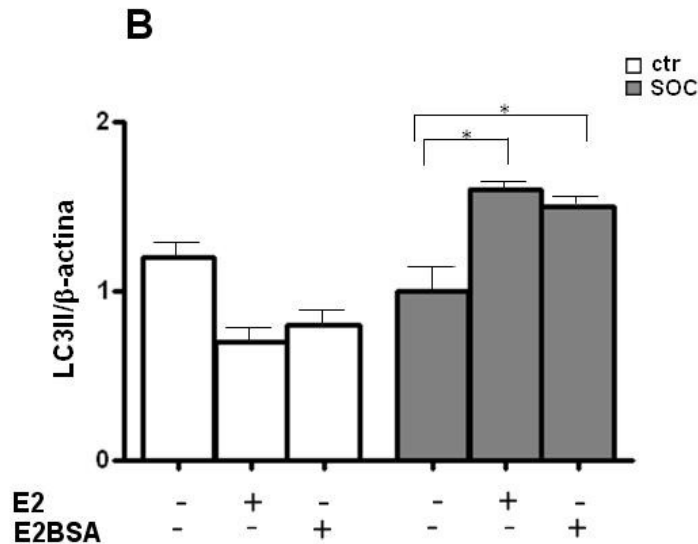


Figura. 10. Analisi del coinvolgimento di mER α nel controllo del destino cellulare: autofagia.

L'espressione di LC3II è stata valutata, mediante Western blot, dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con E2, E2BSA e H₂O₂. La β -actina è stata utilizzata per normalizzare le quantità proteiche caricate. (A) Esperimento rappresentativo di tre effettuati. E' possibile osservare un aumento significativo dell'espressione di LC3II nelle cellule trattate con E2 e E2BSA dopo SOC. (B) L'istogramma mostra la media \pm DS dei valori ottenuti dall'analisi di densitometria (rapporto LC3II/ β -actina) da tre esperimenti indipendenti. *, $P < 0.05$ differenza significativa delle cellule trattate con H₂O₂ rispetto alle cellule non trattate e rispetto alle cellule trattate con H₂O₂ in presenza di E2 e E2BSA.

Per valutare se gli effetti degli estrogeni sulla modulazione del processo autofagico fossero mediati da mER α abbiamo effettuato lo stesso esperimento in cellule trattate con RNAi per ER α . Abbiamo osservato che in queste condizioni l'E2BSA in particolare non era più in grado di indurre un aumento di LC3II in condizioni di stress ossidativo (Fig.11).

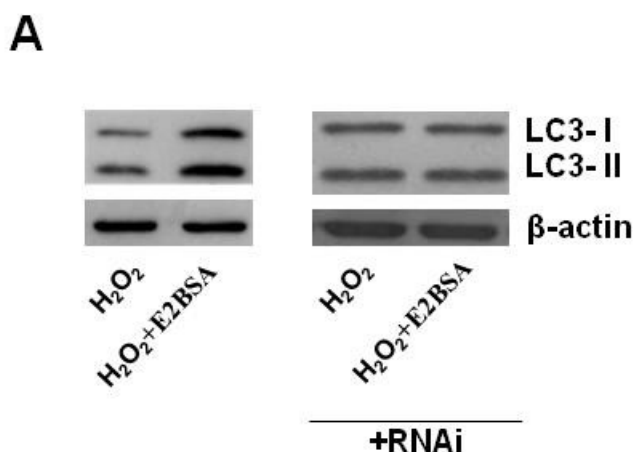


Figura. 11. Analisi del coinvolgimento di mER α nel controllo dell'autofagia.

L'espressione di LC3II è stata valutata, mediante Western blot, dopo trattamento delle cellule SH-SY5Y con H₂O₂, E2BSA e RNAi. La β -actina è stata utilizzata per normalizzare le quantità proteiche caricate. (A) Esperimento rappresentativo di tre effettuati. E' possibile osservare un aumento significativo dell'espressione di LC3II nelle cellule trattate E2BSA dopo SOC, mentre l'RNAi annulla questo effetto, riportando l'espressione dell'LC3II ad una situazione paragonabile a quella dello stress ossidativo.

4.4 Espressione dei recettori degli estrogeni mediante citometria statica su neuroni di ippocampo di embrioni di ratto

Per i nostri esperimenti è stata utilizzata una linea cellulare di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, che rappresenta un modello di neuroni dopaminergici classicamente impiegato per condurre studi in vitro su patologie neurodegenerative. Per confermare i nostri risultati su una linea cellulare primaria abbiamo utilizzato neuroni di ippocampo derivati da embrioni di ratto. Le esigenze sperimentali hanno limitato il nostro studio sui neuroni all'utilizzo della citometria statica come strumento di analisi. Il nostro scopo è stato quello di valutare: 1) se i neuroni esprimevano fisiologicamente mER α ; 2) se lo stress cronico aveva sui neuroni lo stesso effetto che sulle SH-SY5Y in termini espressione di mER α .

I risultati hanno in effetti dimostrato che anche le cellule neuronali in coltura primaria non trattate non esprimevano l'mER α , mentre in condizioni di stress, cronico, l'mER α veniva fortemente espresso in superficie (Fig. 12). In osservazioni parallele e' stata analizzata l'actina ed in particolare il "network" e la sua presenza sulle protrusioni in assenza e presenza di SOC. Quello che abbiamo osservato e' mostrato in Figura 13 dove e' evidente che sotto stress, in accordo con quanto mostrato sulle cellule SH-SY5Y, l'actina appare fortemente riarrangiata e redistribuita formando piccoli "dot-spot" lungo le protrusioni cellulari.

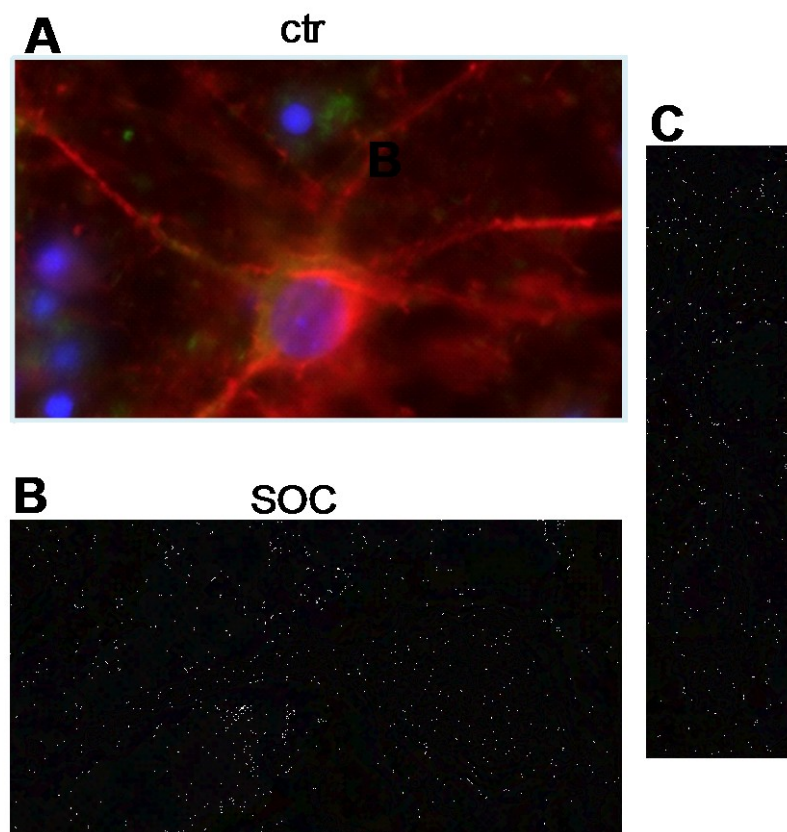


Figura 12. Neuroni murini in coltura primaria. Valutazione dell'espressione di mER in cellule non permeabilizzate (colorazione verde).

Notare la negativita' nelle cellule non trattate (A) rispetto a quelle sotto SOC (B). In (C) si nota una lunga protrusione dendritica positiva per mER. In rosso una colorazione del "network" di actina, in blu i nuclei.

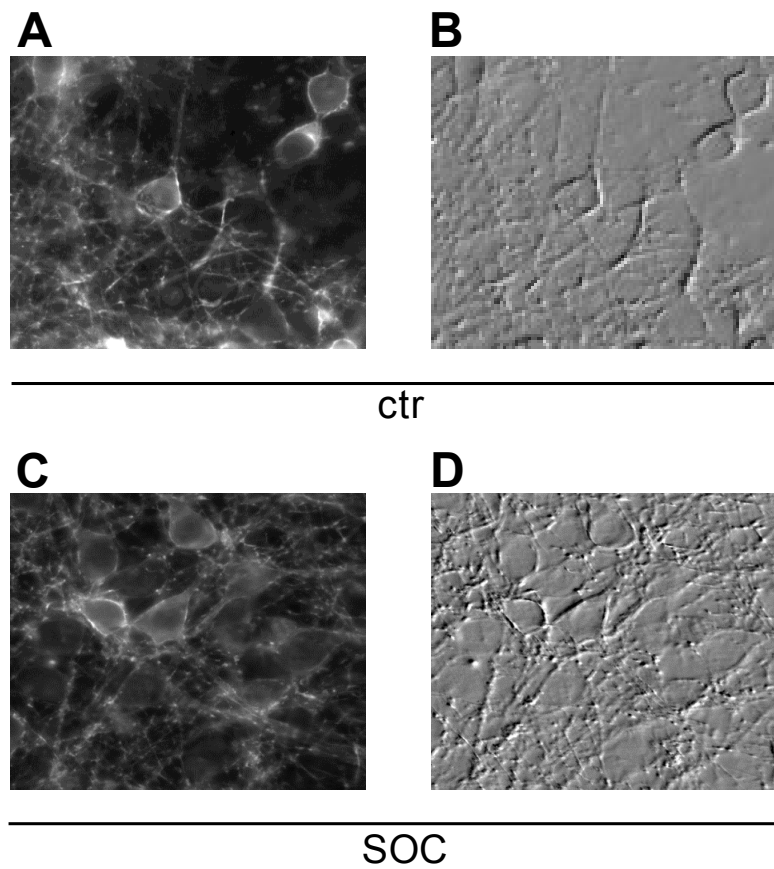


Figura 12. Neuroni murini in coltura primaria. Valutazioni del network di actina in cellule permeabilizzate (a sinistra) ed il corrispondente campo in microscopia a contrasto interferenziale (a destra). Notare come i filamenti di actina siano riarrangiati a formare spot lungo le protrusioni dendritiche delle cellule trattate (C). La parziale retrazione dei prolungamenti e' visibile anche in (D). In (A) e (B) sono mostrate le cellule neuronali di controllo.

5. *Discussione*

In questo studio è stato investigato il ruolo degli estrogeni nel determinare il destino delle cellule neuronali in condizioni fisiologiche o mimando una condizione di stress ossidativo cronico. Nelle nostre condizioni sperimentali, le cellule neuronali esprimono i recettori α e β per gli estrogeni a livello intracellulare mentre non si evidenzia l'espressione di tali recettori sulla superficie cellulare. In seguito a stress cronico, si evidenzia invece l'espressione di ER α sulla membrana plasmatica. Tale espressione è completamente inibita dal trattamento con agenti anti-ossidanti, indicando che è lo stress ossidativo ad indurre la traslocazione in membrana di ER α . L'espressione sulla membrana del recettore potrebbe servire come strategia difensiva della cellula che riesce così a rispondere più prontamente all'effetto protettivo degli estrogeni in caso di stress ambientale. E' infatti ben noto il ruolo protettivo degli estrogeni sui neuroni, ma è meno chiaro quale sia il meccanismo di protezione e quale isoforma del recettore sia coinvolta. In questo studio abbiamo osservato che in condizioni di stress ossidativo cronico, gli estrogeni inducono un significativo aumento della fosforilazione di ERK e un corrispondente aumento del livello di autofagia. I nostri risultati sono in linea con studi precedenti effettuati da noi e da altri gruppi di ricerca che hanno evidenziato come l'attivazione di mER α induca la fosforilazione di ERK^{86,87}. pERK induce un segnale anti-apoptotico di sopravvivenza che è stato anche associato all'aumentato livello di autofagia⁸⁸. Recenti evidenze suggeriscono che nei neuroni e nelle malattie neurodegenerative l'autofagia gioca un ruolo neuroprotettivo⁸⁹. Aberrazioni nella regolazione dell'autofagia sono state descritte in pazienti con AD, morbo di Parkinson, Corea di Huntington, malattia da prioni⁹⁰.

In questo studio, in presenza di stress cronico, abbiamo osservato un'aumentata espressione della molecola p38 e un maggior livello di apoptosi. Gli estrogeni, nel nostro modello, inducono una significativa riduzione di p38 ed una significativa diminuzione della percentuale di cellule apoptotiche. La morte cellulare programmata, chiamata anche apoptosi (in greco "caduta delle foglie o dei petali dei fiori"), è un fenomeno tramite il quale le cellule si "suicidano" mettendo in atto un preciso programma genetico, un meccanismo vitale per lo sviluppo e la sopravvivenza degli organismi superiori. Oggi sappiamo che, quando avviene in modo inappropriato, l'apoptosi è coinvolta nell'insorgenza di numerose gravi patologie, tra cui malattie neurodegenerative come l'AD e la Corea di Huntington ⁹¹. I nostri dati sembrerebbero quindi suggerire che in presenza di debole stress ossidativo cronico che mima condizioni di malattie neurodegenerative gli estrogeni hanno un forte effetto protettivo i) inducendo sopravvivenza cellulare e autofagia; ii) sopprimendo l'induzione di morte cellulare per apoptosi.

Gli effetti osservati degli estrogeni sulle cellule in seguito a stress sembrano essere mediati da mER α , poiché osserviamo che la molecola E2BSA, in grado di legarsi solo a mER α e incapace di entrare all'interno della cellula, induce tutti i segnali osservati da E2, anche con maggior intensità.

L'AD rappresenta un classico esempio di malattia neurodegenerativa in cui gli estrogeni svolgono un ruolo protettivo (effetto ombrello) che viene a mancare dopo la menopausa. L'incidenza di tale malattia infatti aumenta drasticamente nelle donne nel periodo post-menopausa. I nostri dati suggeriscono un ruolo fondamentale di ER α espresso sulla membrana dei neuroni nella protezione verso una patologia così severa e debilitante. Il trattamento con estrogeni ha dato in

passato risultati contrastanti, che sono almeno in parte da attribuire ad esempio al tipo diverso di molecola utilizzata nei vari studi, alla modalita' di somministrazione, alla dose utilizzata, al tipo di progestinico associato, ed all'eta' eterogenea delle pazienti. A questo proposito appare fondamentale la somministrazione di estrogeni nel periodo immediatamente successivo alla menopausa per potere ottenere pieno beneficio a livello cerebrale. Recenti studi hanno evidenziato che durante l'invecchiamento si altera il rapporto ER α :ER β a vantaggio di ER β e viene quindi meno l'effetto protettivo degli estrogeni ⁸². Quindi ulteriori studi serviranno per chiarire e definire i meccanismi di traslocazione sulla superficie dell'isoforma α del recettore degli estrogeni per mettere a punto approcci terapeutici innovativi che permettano di prolungare e sfruttare al massimo l'effetto protettivo degli estrogeni.

6. Bibliografia

1. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* **13**, 635-638 (2004).
2. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* **11**, 411-423 (2005).
3. Karpuzoglu E, Zouali M. The Multi-faceted Influences of Estrogen on Lymphocytes: Toward Novel Immuno-interventions Strategies for Autoimmunity Management. *Clin Rev Allergy Immunol* **40**, 16-26 (2009).
4. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* **9**, 295-318 (1988).
5. Jordan VC, Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman ME. Structure-activity relationships of estrogens. *Environ Health Perspect* **61**, 97-110 (1985).
6. Duax WL, Griffin JF, Weeks CM, Wawrzak Z. The mechanism of action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *J Steroid Biochem* **31**, 481-492 (1988).
7. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* **72**, 381-405 (2007).
8. Zhao L, O'Neill K, Diaz Brinton R. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res Brain Res Rev* **49**, 472-493 (2005).

9. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* **27**, 299-402 (2006).
10. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* **81**, 1535-1565 (2001).
11. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J* **19**, 4688-4700 (2000).
12. Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, Korach KS, Sonntag-Buck V, Gannon F. ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol* **15**, 2064-2077 (2001).
13. Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4807-4812 (2003).
14. Miller NR, Jover T, Cohen HW, Zukin RS, Etgen AM. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology* **146**, 3070-3079 (2005).
15. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* **6**, 225-36 (2000).
16. Zhao L, Brinton RD. Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res* **1172**, 48-59 (2007).

17. McEwen BS. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* **91**, 2785–2801 (2001).
18. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1952–1957 (2001).
19. Miller NR, Jover T, Cohen HW, Zukin RS, Etgen AM. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology* **146**, 3070–3079 (2005).
20. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* **19**, 6385–6393 (1999).
21. Wu TW, Wang JM, Chen S, Brinton RD. 17Beta-estradiol induced Ca²⁺influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* **135**, 59–72 (2005).
22. Kummer S, Jeruschke S, Wegerich LV, Peters A, Lehmann P, Seibt A, Mueller F, Koleganova N, Halbenz E, Schmitt CP, Bettendorf M, Mayatepek E, Gross-Weissmann ML, Oh J. Estrogen Receptor Alpha Expression in Podocytes Mediates Protection against Apoptosis In-Vitro and In-Vivo. *PLoS One* **6**, e27457 (2011).
23. Walton MR, Dragunow M. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends in Neurosciences* **23**, 48–53 (2000).
24. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* **21**, 127–148 (1998).

25. Zhang QG, Wang R, Khan M, Mahesh V, Brann DW. Role of Dickkopf-1, an antagonist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, in estrogen-induced neuroprotection and attenuation of tau phosphorylation. *J Neurosci* **28**, 8430-8441 (2008).
26. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2711–2716(2008).
27. Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*, **16**, 140–153 (2008).
28. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 477-482 (2009).
29. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* **19**, 833-842 (2005).
30. Zhang D, Trudeau VL. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **144**, 306-315 (2006).
31. Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **23**, 1633-1646 (2003).
32. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* **20**, 1996-2009 (2006).
33. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* **16**, 231-237 (2005).

34. Galluzzo P, Caiazza F, Moreno S, Marino M. Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr Relat Cancer* **14**, 153-167 (2007).
35. Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, Levin ER. Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* **280**, 19704-19710 (2005).
36. Kalita K, Szymczak S, Kaczmarek L. Non-nuclear estrogen receptor beta and alpha in the hippocampus of male and female rats. *Hippocampus* **15**, 404-412 (2005).
37. Zhao L, Brinton RD. Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res* **1172**, 48–59 (2007).
38. Choi YC, Lee JH, Hong KW, Lee KS. 17 Beta-estradiol prevents focal cerebral ischemic damages via activation of Akt and CREB in association with reduced PTEN phosphorylation in rats. *Fundam Clin Pharmacol* **18**, 547–557 (2004).
39. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, Wise PM. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 1253–1258 (1998).
40. Yang LC, Zhang QG, Zhou CF, Yang F, Zhang YD, Wang RM, Brann DW. Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus. *PLoS One* **5**, e9851 (2010).
41. Taguchi Y, Koslowski M, Bodenner DL. Binding of estrogen receptor with estrogen conjugated to bovine serum albumin (BSA). *Nucl Recept* **2**, 5 (2004).
42. Aguilar R, Bellido C, Garrido-Gracia JC, Alonso R, Sanchez-Criado JE. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate estradiol-BSA inhibit tamoxifen-

- stimulated prolactin secretion in incubated rat pituitaries. *Reproduction* **131**, 763–769 (2006).
43. Shughrue PJ, Merchenthaler I. Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. *Neuroscience* **116**, 851–861 (2003).
 44. Choi YC, Lee JH, Hong KW, Lee KS. 17 Beta-estradiol prevents focal cerebral ischemic damages via activation of Akt and CREB in association with reduced PTEN phosphorylation in rats. *Fundam Clin Pharmacol* **18**, 547–557 (2004).
 45. Malinowska-Kolodziej I, Larysz-Brysz M, Jedrzejowska-Szypulka H, Marcol W, Wlaszczuk A, Lewin-Kowalik J. 17beta-estradiol and predegenerated nerve graft effect on hippocampal neurogenesis in adult female rats. *Neuro Endocrinol Lett* **30**, 195-203 (2009).
 46. Barker JM, Galea LA. Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuro Endocrinol Lett* **30**, 195-203 (2009).
 47. Barha CK, Lieblich SE, Galea LA. Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neuroendocrinol* **21**, 155-66 (2009).
 48. Altman J, Bayer SA. Regional differences in the stratified transitional field and the honeycomb matrix of the developing human cerebral cortex. *J Neurocytol* **31**, 613-32 (2002).
 49. Morrens J, Van Den Broeck W, Kempermann G. Glial cells in adult neurogenesis. (2011) [Epub ahead of print].
 50. Gemma C, Bachstetter AD, Bickford PC. Neuron-Microglia Dialogue and Hippocampal Neurogenesis in the Aged Brain. *Aging Dis* **1**, 232-244 (2010).

51. Mellon SH. Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther* **116**, 107-124 (2007).
52. Giachino C, Galbiati M, Fasolo A, Peretto P, Melcangi R. Neurogenesis in the subependymal layer of the adult rat: a role for neuroactive derivatives of progesterone. *Ann N Y Acad Sci* **1007**, 335-339 (2003).
53. Alhola P, Polo-Kantola R, Erkkola R, Portin R. Estrogen therapy and cognition: a 6-year single-blind follow-up study in postmenopausal women. *Neurology* **67**, 706–709 (2006).
54. Asthana S, Craft LD, Baker MA, Raskind RS, Birnbaum CP, Lofgreen RC, Veith RC, Plymate SR. Cognitive and neuroendocrine response to transdermal estrogen in postmenopausal women with Alzheimer's disease: results of a placebo-controlled, double-blind, pilot study. *Psychoneuroendocrinology* **24**, 657–677 (1999).
55. Alkayed NJ, Goto S, Sugo N, Joh HD, Klaus J, Crain BJ, Bernard O, Traystman RJ, Hurn PD. Estrogen and Bcl-2: gene induction and effect of transgene in experimental stroke. *J Neurosci* **21**: 7543–7550 (2001).
56. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* **72**, 381–405 (2007).
57. Zhang QG, Wang R, Khan M, Mahesh V, Brann DW. Role of Dickkopf-1, an antagonist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, in estrogen-induced neuroprotection and attenuation of tau phosphorylation. *J Neurosci* **28**, 8430–8441 (2008).

58. Lucignani G. Rubor, calor, tumor, dolor, functio laesa. or molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**, 2135-2141 (2007).
59. Parakrama Chandrasoma, Clive R. Taylor (ca. 2005). "Part A. General Pathology, Section II. The Host Response to Injury, Chapter 3. The Acute Inflammatory Response, sub-section Cardinal Clinical Signs". Concise Pathology (3rd edition (Computer file) ed.). New York, N.Y.: McGraw-Hill.
60. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol* **147**, 455-460 (2007).
61. Birge S.J. The role of estrogen in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology* **48**, S36–S41 (1997).
62. Niewada M, Kobayashi A, Sandercock PA, Kaminski B, Czlonkowska A. Influence of gender on baseline features and clinical outcomes among 17,370 patients with confirmed ischaemic stroke in the international stroke trial. *Neuroepidemiology* **24**, 123–128 (2005).
63. Di Carlo A, Lamassa M, Baldereschi M, Pracucci G, Basile AM, Wolfe CD, Giroud M, Rudd A, Ghetti A, Inzitari D; European BIOMED Study of Stroke Care Group. Sex differences in the clinical presentation, resource use, and 3-month outcome of acute stroke in Europe: data from a multicenter multinational hospital-based registry. *Stroke* **34**, 1114–1119 (2003).
64. Renoux C, Suissa S. Womens Hormone therapy administration in postmenopausal women and risk of stroke. *Health (Lond Engl)* May;**7**, 355-361 (2011).
65. Jackson J, Bliss D, Hepburn K, Arntson C, Mullins J, Rolnick S. PS2-20: The Development of Educational Materials to Assist Family and Friend Caregivers and

- Healthcare Providers in Caring For Persons with Incontinence and Dementia. *Clin Med Res* **9**, 158 (2011).
66. Lahiri DK, Maloney B. Beyond the signaling effect role of amyloid- β 42 on the processing of APP, and its clinical implications. *Exp Neurol* **225**, 51-54 (2010).
67. Martín-Aragón S, Bermejo-Bescós P, Benedí J, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM. Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurochem Res* **34**, 373-378 (2009).
68. Amtul Z, Wang L, Westaway D, Rozmahel RF. Neuroprotective mechanism conferred by 17 β -estradiol on the biochemical basis of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **169**, 781-786 (2010).
69. Li Y, Shen LB, Yang LF, Lue C, Finch C, Rogers J. Estrogen enhances uptake of amyloid beta-protein by microglia derived from the human cortex. *J Neurochem* **75**, 1447–1454 (2000).
70. Morinaga A, Ono K, Takasaki J, Ikeda T, Hirohata M, Yamada M. Effects of sex hormones on Alzheimer's disease-associated β -amyloid oligomer formation in vitro. *Exp Neurol* **228**, 298-302 (2011).
71. Abbas AM, Elsamanoudy AZ. Can J Effects of 17 β -estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. *Physiol Pharmacol* **89**, 497-504 (2011).
72. Li Y, Duffy KB, Ottinger MA, Ray B, Bailey JA, Holloway HW, Tweedie D, Perry T, Mattson MP, Kapogiannis D, Sambamurti K, Lahiri DK, Greig NH. GLP-1 receptor stimulation reduces amyloid-beta peptide accumulation and cytotoxicity in cellular and animal models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **19**, 1205-1219 (2010).

73. Correia SC, Santos RX, Cardoso S, Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Effects of estrogen in the brain: is it a neuroprotective agent in Alzheimer's disease? *Curr Aging Sci* **3**, 113-126 (2010).
74. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **10**, 177-196 (1998).
75. Stegh AH, DePinho RA. Beyond effector caspase inhibition: Bcl2L12 neutralizes p53 signaling in glioblastoma. *Cell Cycle* **10**, 33-38 (2011).
76. Ericsson JL. Studies on induced cellular autophagy. I. Electron microscopy of cells with in vivo labelled lysosomes. *Exp Cell Res* **55**, 95-106 (1969).
77. Codogno P. ATG genes and macroautophagy. *Med Sci* **20**, 734-736 (2004).
78. Tanida I. Autophagy basics. *Microbiol Immunol* **55**, 1-11 (2011).
79. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ* **10**, (2011) [Epub ahead of print].
80. Wu TW, Wang JM, Chen S, Brinton RD. 17Beta-estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* **135**, 59-72 (2011).
81. Yang LC, Zhang QG, Zhou CF, Yang F, Zhang YD, Wang RM, Brann DW. Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus. *PLoS One* **7**, e9851 (2010).

82. Novensà L, Novella S, Medina P, Segarra G, Castillo N, Heras M, Hermenegildo C, Dantas AP. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. *PLoS One* **6**, e25335 (2011).
83. Cheung ZH, Ip NY. Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives. *J Neurochem* **118**, 317-325 (2011).
84. Corcelle E, Djerbi N, Mari M, Nebout M, Fiorini C, Fénichel P, Hofman P, Poujeol P, Mograbi B. Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* **3**, 57-59 (2007).
85. Chadwick W, Zhou Y, Park SS, Wang L, Mitchell N, Stone MD, Becker KG, Martin B, Maudsley S. Minimal peroxide exposure of neuronal cells induces multifaceted adaptive responses. *PLoS One* **17**, e14352 (2010).
86. Pierdominici M, Maselli A, Colasanti T, Giammarioli AM, Delunardo F, Vacirca D, Sanchez M, Giovannetti A, Malorni W, Ortona E. Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. *Immunol Lett* **132**, 79-85 (2010).
87. Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalance A, Muramatsu M, Marino M. Survival versus apoptotic 17 β -estradiol effect: role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol* **203**, 193-201 (2005).
88. Uglund H, Naderi S, Brech A, Collas P, Blomhoff HK. cAMP induces autophagy via a novel pathway involving ERK, cyclin E and Beclin 1. *Autophagy* **7**, 1199-1211(2011).
89. Larsen KE, Sulzer D. Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol* **17**, 897-908 (2002).

90. Cheung ZH, Ip NY. Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives. *J Neurochem* **118**, 317-325 (2011).
91. Barzilai A. DNA damage, neuronal and glial cell death and neurodegeneration. *Apoptosis* **15**, 1371-1381 (2010).