

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE



DIPARTIMENTO DI MEDICINA E SCIENZE DELLA SALUTE

VINCENZO TIBERIO

Dottorato di Ricerca in

MEDICINA TRASLAZIONALE E CLINICA XXXI CICLO

***Alterazioni del metabolismo dei sialo-glico-coniugati
in modelli preclinici di malattie neurologiche rare***

Coordinatore

Prof.

COSTAGLIOLA **Ciro**

SSD MED 30

Relatore

Prof. ssa

CARNEVALE **Daniela**

SSD MED 50

Correlatore

Dottor

MAGLIONE **Vittorio**

Candidato

PEPE **Giuseppe**

Anno Accademico 2017/2018

A Tina

Sommario

ABSTRACT	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Il Metabolismo dell'Acido Sialico.....	5
1.2 I Sialo-Glico-Coniugati: Glicolipidi e Glicoproteine	7
2. La Malattia di Huntington	13
2.1 Epidemiologia della MH.....	13
2.2 Genetica della MH	14
2.3 La proteina Huntingtina	15
2.4 Le funzioni dell'Huntingtina	15
2.5 Neuropatologia della MH	17
2.6 Caratteristiche Cliniche.....	18
2.6.1 Disturbi motori	18
2.6.2 Disturbi cognitivi.....	18
2.6.3 Disturbi psichiatrici	18
2.7 MH e Neurosviluppo	19
3. La Sindrome di Rett.....	19
3.1 Genetica della RTT	20
3.2 MeCP2 (methyl CpG binding protein)	21
3.3 MeCP2 ed il Controllo dell'Espressione Genica	23
3.4 Quadro Clinico della Sindrome di Rett.....	25
3.4.1 Fase 1: tra i 6 e 18 mesi.....	25
3.4.2 Fase 2: dai 18 mesi ai 3 anni	25
3.4.3 Fase 3: stadio pseudo stazionario	25
3.4.4 Fase 4: all'incirca dopo 10 anni	25

4. DISFUNZIONI GLICO-LIPIDICHE NELLA MH E NELLA RTT	26
4.1 MH	26
4.2 RTT	27
5. IPOTESI E SCOPO DEL LAVORO.....	28
6. MATERIALI E METODI	30
6.1 Modelli Animali.....	30
6.2 Somministrazione di Farmaci in Vivo	31
6.3 Western Blot	31
6.5 Estrazione di RNA da tessuto e Real-Time-PCR	32
6.6 Analisi Statistica	33
7. RISULTATI	34
7.1 I Livelli di PolySia sono Ridotti nel Modello di MH R6/2 in Fase Avanzata di Malattia	34
7.2 I Livelli di PolySia sono Alterati nel Modello di MH R6/2 in Fase Iniziale di Malattia	35
7.3 I Livelli di PolySia sono Alterati nel Modello di MH R6/2 in Fase Presintomatica di Malattia	35
7.4 I Livelli di mRNA, di ST8Sia2 e ST8Sia4, sono Ridotti nel Modello di MH R6/2 in Fase Avanzata di Malattia.....	36
7.5 I Livelli di mRNA di ST8Sia2 sono Ridotti nel Modello di MH R6/2 in Fase Iniziale di Malattia.....	37
7.6 I Livelli di mRNA di ST8Sia4 sono Aumentati nel Modello di MH R6/2 in Fase Presintomatica di Malattia	38
7.7 I Livelli di PolySia sono Alterati in Embrioni di Topi MH.....	39
7.8 I Livelli delle Lectine SNA e MAL II sono Alterati nella Corteccia di Topi MH	40
7.9 La Modulazione dei Sialo-Glico-Coniugati è Possibile in Vivo	41
7.10 I Livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di St3gal5 e B3galt4 sono Ridotti nel Cervelletto del Modello RTT Mecp2 ^{Bird} in Fase Avanzata di Malattia.....	42

7.11 I Livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di Neu1 sono Alterati nell'Ippocampo del Modello RTT Mecp2 ^{Bird} in Fase Avanzata di Malattia	44
7.12 I Livelli di GM1 e GD1a e l'Espressione Genica di B3gal4 sono Alterati nella Corteccia del Modello RTT Mecp2 ^{Bird} in Fase Avanzata di Malattia	45
7.13 I Livelli di GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di Neu1 sono Alterati nello Striato del Modello RTT Mecp2 ^{Bird} in Fase Avanzata di Malattia.....	46
7.14 L'Espressione Genica di ST8Sia2 e ST8Sia4 è Ridotta nel Cervello del Modello RTT Mecp2 ^{Bird} in Fase Avanzata di Malattia.....	47
8. DISCUSSIONE	48
9. APPENDICE	52
10. BIBLIOGRAFIA	57

ABSTRACT

I sialo-glico-coniugati, glicolipidi e glicoproteine, rappresentano una componente fondamentale per lo sviluppo ed il mantenimento dell'omeostasi del sistema nervoso centrale (SNC). Infatti, un alterato metabolismo dei sialo-glico-coniugati è associato a diverse malattie neurologiche. L'obiettivo del mio progetto di tesi è quello di valutare se il metabolismo dei sialo-glico-coniugati è alterato in modelli preclinici di Malattia di Huntington (MH) e di Sindrome di Rett (RTT). I risultati ottenuti mostrano una globale alterazione dei sialo-coniugati nella MH già in fase pre-sintomatica e una alterazione del metabolismo dei gangliosidi nella RTT. I dati indicano che le alterazioni del metabolismo dei sialo-glico-coniugati potrebbero rappresentare da un lato un fattore cruciale nell'eziopatogenesi delle due malattie e dall'altro un nuovo *target* terapeutico per lo sviluppo di nuovi farmaci.

ABSTRACT

Sialo-glico-conjugates, glycolipids and glycoproteins, are a fundamental component for the development and maintenance of central nervous system (CNS) homeostasis. In fact, an altered metabolism of the sialo-glico-conjugates is associated with various neurological diseases. The aim of my thesis project is to evaluate whether the metabolism of sialo-glico-conjugates is altered in preclinical models of Huntington's Disease (MH) and Rett Syndrome (RTT). The results obtained show a global alteration of sialo-conjugates in HD already in the pre-symptomatic phase and an alteration of ganglioside metabolism in RTT. The data indicate that the alterations of the metabolism of the sialo-glico-conjugates could represent on the one hand a crucial factor in the etiopathogenesis of the two diseases and on the other a new therapeutic target for the development of new drugs.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Metabolismo dell'Acido Sialico

I sialo-glico-coniugati sono molecole complesse contenenti acido sialico (Sia), uno zucchero acido a 9 atomi di carbonio (Schnaar et al., 2014). L'acido N-acetilneuroaminico (Neu5Ac) è la forma più comune di Sia presente nell'uomo; altre due forme meno abbondanti sono l'acido N-glicolilneuroaminico (Neu5Gc) presente in alcuni tumori umani e in alcuni cibi e l'acido cheto-deossi-nonulosonico (KDN) presente negli eritrociti fetali umani e in alcuni tumori dell'ovaio (figura 1) (Bing Wang, 2009).

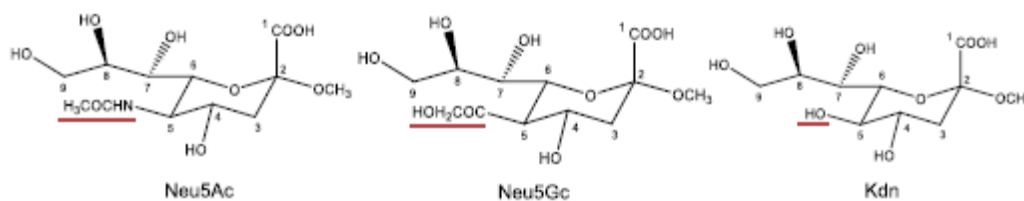


Figura 1. Rappresentazione strutturale dei membri della famiglia di Sia. A) Neu5Ac, B) Neu5Gc e C) KDN (Li e Ding, 2018).

In termini evolutivi Sia è espresso abbondantemente nella linea dei deuterostomi (vertebrati ed alcune specie di invertebrati). *Drosophila*, ad esempio, presenta sequenze geniche simili ai mammiferi in geni coinvolti nel metabolismo dell'acido sialico (Koles et al., 2009). Nelle altre linee, quali: batteri, *archaea*, piante, funghi, protozoi e protostomi, l'espressione di Sia è stata osservata solo in alcune specie. Per esempio, alcuni batteri neuro-invasivi, quali *Escherichia coli* K1 e *Neisseria meningitidis* esprimono omopolimeri di Sia denominati acido polisialico (polySia) (Vimr et al., 2004).

Oltre alla fonte proveniente dalla dieta, i mammiferi hanno la capacità di sintetizzare Sia partendo dal glucosio; l'interruzione della biosintesi di Sia è letale in embrioni di topi e mutazioni a carico di tale metabolismo si traducono in diverse patologie (Bing Wang, 2009). L'enzima chiave della sintesi di Sia è UDP-N-acetilglucosammina-2-epimerasi/N-acetilmannosamina-chinasi (GNE) che epimerizza l'UDP-GlcNAc (N-acetilglucosammina) in ManNAc (N-acetil mannosamina) e successivamente fosforila ManNAc in ManNAc-6-fosfato. L'attività di GNE è regolata sia a *feedback* negativo da CMP-Sia che a livello trascrizionale. Il ManNAc-6-fosfato viene convertito dalla sintasi NANS (N-acetil acido

neuroamminico sintasi) in Neu5Ac-9-fosfato e successivamente defosforilato dalla fosfatasi NANP (N-acetil acido neuroamminico fosfatasi) in Neu5Ac. L'acido sialico così formatosi è traslocato nel nucleo e attivato a CMP-Sia da CMAS (citidina monofosfato acido N-acetilneuroamminico sintasi) (figura 2). I meccanismi di questa traslocazione non sono ancora del tutto chiari (Li e Ding, 2018).

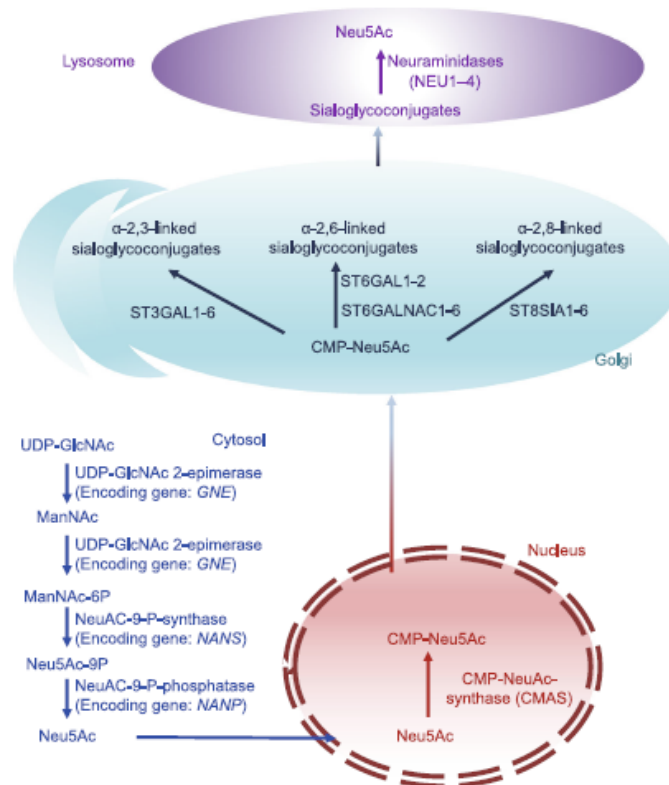


Figura 2. Rappresentazione schematica della sintesi di Sia (Li e Ding, 2018).

CMP-Sia è aggiunto enzimaticamente alla catena dei glicani (glicolipidi e/o glicoproteine) attraverso uno solo dei cinque legami possibili: α 2-3 o α 2-6 legante il galattosio (Gal), α 2-6 legante la N-acetilgalattosamina (GalNAc) o la N-acetilglucosamina (GluNAc) e α 2-8 legante un altro Sia (Schnaar et al., 2014). Gli enzimi responsabili del trasferimento di CMP-Sia sulla catena dei glicani sono denominati sialiltransferasi (ST). Nei mammiferi esistono 20 sialiltransferasi, suddivise in quattro famiglie in base al legame glicosidico che generano (α 2-3, α 2-6 e α 2-8) e al primo zucchero accettore (Gal, GalNAc e Sia). Gli enzimi ST3gal

(1-6) aggiungono residui di Sia, attraverso un legame α 2-3 al galattosio di glicolipidi e glicoproteine. Gli enzimi ST6Gal (1-2) e ST6GalNAc (1-6) aggiungono residui di Sia, attraverso un legame α 2-6 rispettivamente al galattosio e all’N-acetilgalattosamina di glicolipidi e glicoproteine. Gli enzimi ST8Sia (1-6) catalizzano il trasferimento di Sia, attraverso un legame α 2-8 ad un altro Sia di glicolipidi e glicoproteine. Le ragioni evolutive e meccanicistiche di tale specificità enzimatica non sono ancora del tutto chiare (Schnaar et al., 2014). Esistono anche enzimi denominati neuroaminidasi (NEU) che rimuovono Sia dalla catena di glicani a cui è legato. Tali enzimi non presentano, al contrario delle sialiltransferasi, una sensibilità legame specifica e presentano invece una distribuzione subcellulare variabile. NEU1, la più abbondante neuroaminidasi nei mammiferi, è primariamente intra-lisosomiale ed è attiva sulle glicoproteine ma non sui gangliosidi. NEU2, a localizzazione citoplasmatica, ha l’abilità di rimuovere Sia da diverse classi di glicani. NEU3 invece, si trova sulla membrana plasmatica ed è selettiva per i gangliosidi, mentre NEU4, principalmente espressa sulla membrana intracellulare, ha un ampio spettro d’azione (Glanz et al., 2019). Oltre al loro ruolo nel catabolismo dei sialo-glico-coniugati le neuroaminidasi sono coinvolte anche in altri processi metabolici. Per esempio, NEU3 è implicata nella crescita dei neuroni ippocampali, mentre NEU1 è *up*-regolata nei monociti in via di differenziamento e sulle cellule T attive. Inoltre, entrambe sono coinvolte nella differenziazione del muscolo scheletrico (Schnaar et al., 2014).

Mutazioni a carico del metabolismo dell’acido sialico causano malattie rare che portano all’accumulo o alla deficienza di Sia. Mutazioni da perdita di funzione nel gene GNE sono alla base della miopatia ereditaria da corpi d’inclusione, mentre mutazioni nel sito allosterico dello stesso enzima causano la saluria caratterizzata da un accumulo di acido sialico (Leroy et al., 2001). La *Salla disease* invece, anch’essa una malattia rara, causata da mutazioni in un trasportatore di membrana lisosomiale di Sia, SLC17A5, è un disordine da accumulo lisosomiale di acido sialico, risultante in una patologia del SNC (Verheijen et al., 1999).

1.2 I Sialo-Glico-Coniugati: Glicolipidi e Glicoproteine

I sialo-glico-coniugati si suddividono in due grandi classi: glicolipidi e glicoproteine, entrambi importanti per lo sviluppo neurale, la trasmissione sinaptica, la cognizione, la formazione della memoria e il normale funzionamento del sistema immunitario (Schnaar et al., 2014).

I glicolipidi che costituiscono il Sistema Nervoso Centrale (SNC) sono la sfingomieline e i glicosfingolipidi, in particolar modo i gangliosidi, i maggiori componenti delle membrane neuronali (Schnaar et al., 2014). I gangliosidi sono glicosfingolipidi complessi, contenenti uno o più residui di acido sialico, ubiquitariamente distribuiti nelle membrane cellulari (*lipid raft*) di tutti i vertebrati e rappresentanti circa il 75% delle molecole coniugate a Sia (Schnaar et al., 2014). Strutturalmente, i gangliosidi sono molecole anfipatiche, costituiti da una porzione idrofobica denominata ceramide, formata da un amminoalcol, la sfingosina e una singola catena di acidi grassi. La porzione idrofilica invece, è composta da una catena oligosaccaridica contenente zuccheri neutri, quali: glucosio, galattosio, N-acetilglucosamina, N-acetilgalattosamina, fucosio e acido sialico (Schnaar et al., 2014). Inoltre, i gangliosidi si suddividono in base al numero di molecole di acido sialico: GM1 in cui è presente una sola molecola di acido sialico, GD1 e GT1 in cui sono presenti rispettivamente due e tre molecole di acido sialico (figura 3).

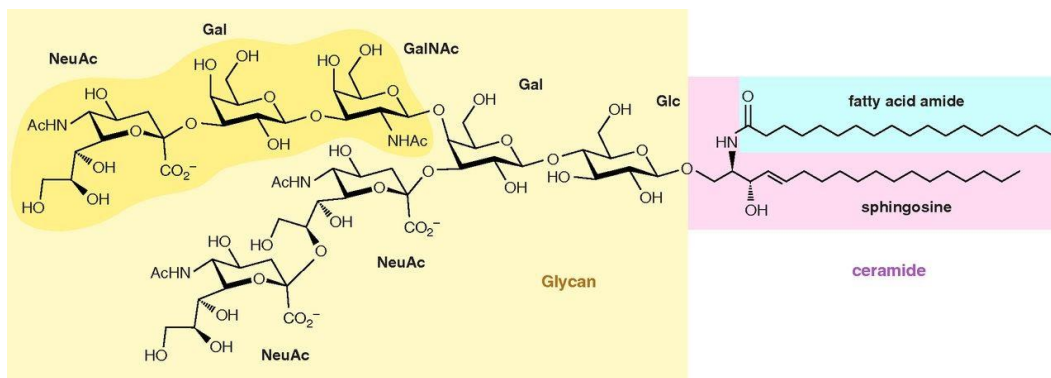


Figura 3. Rappresentazione strutturale del ganglioside GT1b (Schnaar et al., 2014).

I ricercatori hanno individuato più di 200 gangliosidi strutturalmente diversi, in diversi tessuti e in diversi organismi, ma nel cervello dei mammiferi adulti quattro sono i gangliosidi dominanti: GM1, GD1a, GD1b e GT1b rappresentanti da soli il 97% del totale. I quattro gangliosidi sono sintetizzati in maniera graduale come rappresentato in figura 4.

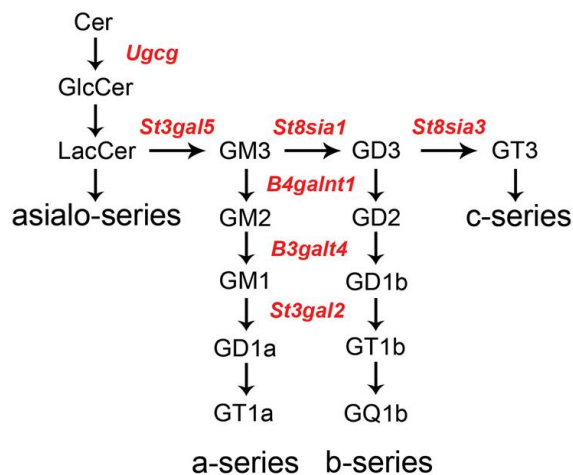


Figura 4. Rappresentazione schematica del metabolismo dei gangliosidi (Maglione et al., 2010).

I gangliosidi rappresentano il 10-12% dei lipidi totale del SNC, partecipando attivamente in diversi processi cruciali per il mantenimento dell'omeostasi del cervello (Posse de Chaves e Sipione, 2010). Per esempio, GM1 potenzia l'azione delle neurotrofine, attivando l'azione dei recettori Trk (*tyrosine receptor kinase*) anche in assenza delle neurotrofine stesse facilitandone il *signalling* cellulare. Nel caso del recettore EGFR (*epidermal growth factor receptor*), la glicosilazione di TrkA sembrerebbe favorire l'interazione con GM1, il quale a sua volta faciliterebbe la dimerizzazione del recettore e la sua fosforilazione (Posse de Chaves e Sipione, 2010). Di notevole importanza anche il ruolo svolto dai gangliosidi nell'interazione cellula-cellula e assone-mielina. In particolar modo, la stabilità della mielina e la corretta funzionalità assonale dipendono dall'interazione di GD1a e GT1b, i due gangliosidi più abbondanti sulla membrana assonale, con la *myelin associated glycoprotein* (MAG), una proteina transmembrana che lega l'acido sialico, appartenente alla famiglia delle Siglec (*Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*). Topi privi di questi due gangliosidi, GM2/GD2 sintasi nulli, mostrano un fenotipo neurodegenerativo caratterizzato da degenerazione assonale e demielinizzazione del SNC (Posse de Chaves e Sipione, 2010). Mutazioni a carico degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei gangliosidi sono associate a diverse condizioni patologiche rare. Per esempio, variazioni nella sequenza genica di St3gal5 (GM3 sintasi), enzima chiave nella sintesi dei gangliosidi, causano epilessia infantile accompagnata da ipotonia e deterioramento neurologico (Simpson et al., 2004). Mutazioni a carico delle due subunità della GM2 sintasi, HEXA e HEXB, causano rispettivamente la malattia di Tay Sachs e la malattia di Sandhoff, due disordini rari da accumulo lisosomiale

di gangliosidi, caratterizzate da una progressiva neurodegenerazione (Bley et al., 2011). La sindrome di Guillain-Barrè invece, è definita come una polineuropatia acuta demielinizzante, caratterizzata dalla produzione di anticorpi anti GM1 e anti GD1a (Van Doorn et al., 2008).

Diverse evidenze inoltre, indicano che i gangliosidi svolgono un ruolo centrale in diverse malattie neurodegenerative: la malattia di Alzheimer, la malattia di Parkinson e la malattia di Huntington; nonché in disordini dello spettro autistico (ASD) (Posse de Chaves e Sipione, 2010).

Nel SNC i monomeri di Sia possono formare dimeri (diSia), oligomeri (oligoSia) e polimeri (polySia), attraverso la ripetizione di legami α 2-8. Polimeri di Sia sono prodotti sia dalle cellule procariotiche che dalle cellule eucariotiche. Nei vertebrati polySia consiste in un polimero lineare di Sia, di circa 90 unità, presente sulla superficie della membrana plasmatica, che lega esclusivamente le proteine (Hilderbrandt e Dityatev, 2015). La principale proteina che viene modificata post-traduzionalmente da polySia è *neural cell adhesion molecule* (NCAM), un membro della famiglia delle molecole di adesione, notevolmente importante per lo sviluppo del cervello, la migrazione neuronale, la formazione della mielina e la plasticità sinaptica (Hilderbrandt e Dityatev, 2015). Tuttavia, NCAM non è l'unica proteina modificata da polySia. Un numero limitato di altre proteine polisialilate sono state descritte, quali: il recettore *scavenger* CD36 nel latte umano, neuropilina-2 sulle cellule dendritiche umane e i due enzimi denominati ST8Sia2 e ST8Sia4, che sintetizzano esclusivamente polySia, attraverso un processo denominato "autopolisializzazione" (Hilderbrandt e Dityatev, 2015). Inoltre, nel SNC sono state individuate altre due proteine polisialilate, quali: la subunità *alpha* del canale del sodio in ratti adulti (Zuber et al., 1992) e la molecola di adesione cellulare sinaptica 1 (SynCAM 1) nel cervello di topi durante il primo periodo post-natale (Galuska et al., 2010).

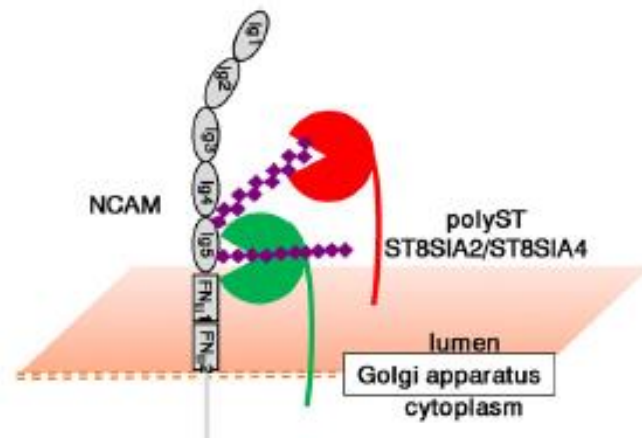


Figura 5. Rappresentazione schematica della sintesi di PolySia (Sato et al., 2016).

ST8Sia2 e ST8Sia4 presentano un'alta omologia di sequenza, con un dominio N-terminale citoplasmatico ed un dominio catalitico nel lume dell'apparato del Golgi. Esistono marcate differenze di espressione genica tra ST8Sia2 e ST8Sia4 sia a livello temporale che tissutale, suggerendo una regolazione trascrizionale indipendente tra i due enzimi. Infatti, ST8Sia2 è principalmente espresso durante lo sviluppo embrionale, mentre ST8Sia4 rappresenta la più abbondante polisialiltransferasi nel cervello adulto (Hilderbrandt e Dityatev, 2015). Inoltre, i livelli di polySia sono drasticamente ridotti nel cervello di topi adulti ST8Sia4 deficienti, tuttavia l'espressione di polySia è mantenuta nelle nicchie neurogeniche (zona subgranulare dell'ippocampo e zona subventricolare dei ventricoli laterali). La perdita di ST8Sia2 invece, ha un effetto minore sui livelli di polySia, nonostante, la chiara riduzione di quest'ultimo in diverse aree del cervello (Eckhardt et al., 2000; Angata et al., 2004). Vi sono diversi *hot-spots* di polySia nel SNC adulto. Oltre a zone in cui c'è una attiva neurogenesi, livelli alti di polySia sono presenti negli interneuroni della corteccia, dell'ippocampo e dell'amigdala. In particolar modo, gli interneuroni della corteccia polySia positivi sono neuroni maturi caratterizzati da una ridotta arborizzazione dendritica e numero di spine, rispetto agli interneuroni polySia negativi (Hilderbrandt e Dityatev, 2015).

PolySia è abbondantemente espresso sui precursori degli oligodendrociti in migrazione (OPC) mentre è *down-regolato* durante la maturazione in oligodendrociti mielinizzanti (Schnaar et al., 2014). Infatti, polySia sembra avere un duplice ruolo durante lo sviluppo degli oligodendrociti, da un lato la sua presenza promuove la migrazione degli OPC in risposta ad uno stimolo chemiotattico, dall'altro aiuta gli OPC a rimanere in uno stato

indifferenziato (Wang et al., 1994; Glaser et al., 2007). Ulteriori studi dimostrano che la polisializzazione mediata da ST8Sia2 influenza la differenziazione degli oligodendrociti e che i deficit degli oligodendrociti in topi ST8Sia2 $-/-$ potrebbero rappresentare la causa della demielinizzazione e degenerazione assonale (Galuska et al., 2010). La perdita di ST8Sia2 non solo colpisce la sintesi di polySia su NCAM ma anche previene completamente la polisializzazione di SynCAM negli OPC (Hilderbrandt e Dityatev, 2015). L'espressione di ST8Sia4 sotto un promotore specifico per gli oligodendrociti previene la riduzione postnatale di polySia negli oligodendrociti, causando un ritardo nella formazione della mielina e difetti nella struttura stessa della mielina (Hilderbrandt e Dityatev, 2015). Inoltre, l'over-espressione di ST8Sia4 causa un rallentamento nella differenziazione degli OPC. La formazione della mielina non necessita della perdita di polySia dalla membrana degli oligodendrociti ma la *down*-regolazione della polisializzazione durante la differenziazione degli oligodendrociti è un prerequisito per una efficiente formazione e per il mantenimento della mielina (Schnaar et al., 2014).

Variazioni della plasticità sinaptica sono funzionalmente associate a stati epilettici. Dato il ruolo chiave di polySia nella plasticità sinaptica, in particolar modo nella *long-term potentiation* (LTP) ippocampale, la quale è inibita in seguito alla rimozione di polySia favorendo la *long-term depression* (LTD), diversi studi indicano il ruolo centrale di polySia nello sviluppo e nella progressione dell'epilessia. Infatti, evidenze scientifiche dimostrano un'aumentata espressione di polySia nell'ippocampo e nella corteccia in lobi epilettici umani (Mikkonen et al., 1998). Inoltre, topi ST8Sia4 $-/-$ mostrano un'alta letalità dovuta ad uno stato epilettico (Pekcec et al., 2008). Numerosi studi suggeriscono un coinvolgimento di polySia anche in malattie neurodegenerative come ad esempio l'Alzheimer, dove polySia è aumentato nel giro dentato dell'ippocampo di pazienti AD (*Alzheimer's disease*) (Mikkonen et al., 1999). PolySia è stato associato inoltre a malattie demielinizzanti, quali sclerosi multipla e Niemann-Pick di tipo C. In particolar modo, sembrerebbe che polySia agisca come inibitore della rimielinizzazione, in quanto la sua presenza è stata individuata su assoni demielinizzanti di lesioni della sclerosi multipla e su assoni ipomielinati della sostanza bianca in un modello murino di Niemann-Pick, mentre assoni rimielinizzanti erano polySia negativi (Takikita et al., 2004).

Un numero minore di cellule polySia positive è stato riscontrato nel giro dentato di cervelli umani *post-mortem* di pazienti schizofrenici, infatti, analisi di sezioni di cervelli di pazienti con disordini psichiatrici ha rilevato che i livelli di polySia non sono alterati nell'amigdala

di pazienti schizofrenici ma che sono ridotti in pazienti depressi ed incrementati in pazienti con disordini bipolari (Varea et al., 2012).

Studi di *genome-wide* hanno individuato *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in NCAM1 e nella regione del promotore di ST8Sia2, ma non di ST8Sia4, associati alla schizofrenia e a disordini bipolari (Arai et al., 2006). Da sottolineare, uno studio condotto su più di 1500 famiglie con ASD che ha identificato una forte associazione tra uno SNP intronico in ST8Sia2 e un sottogruppo di pazienti con ASD, stratificato in base allo stato verbale (Anney et al., 2010).

2. La Malattia di Huntington

La Malattia di Huntington (MH) è una patologia genetica rara, ad insorgenza adulta, caratterizzata da una progressiva degenerazione striatale e corticale, cui sono associati disturbi motori, cognitivi e comportamentali. (Ross and Tabrizi, 2011).

La MH fu descritta per la prima volta nel 1872 dal medico statunitense George Huntington, il quale individuò tre caratteristiche fondamentali della patologia: la natura ereditaria, la tendenza al suicidio e la manifestazione dei sintomi in età adulta. Egli la definì “corea”, dal greco χορεία, in riferimento ai movimenti coreici, rapidi ed involontari tipici della malattia. Nel 1983 gli scienziati identificarono il locus genetico causativo della malattia (Gusella et al., 1983) e solo dieci anni più tardi, nel 1993, identificarono il gene causativo della malattia (MacDonald et al., 1993).

2.1 Epidemiologia della MH

La MH ha una prevalenza di 4-10 individui ogni 100.000 abitanti nelle popolazioni occidentali (Nance, 2017). In alcune aree del Nord Italia, la prevalenza di soggetti affetti è compresa tra 2,3 e 4, 8 individui su 100.000 abitanti e un'indagine epidemiologica condotta in Molise ha rilevato una percentuale di prevalenza stimata intorno a 10,85 casi per 100.000 abitanti (Squitieri et al., 2015). In alcune aree del mondo, per esempio in Venezuela, si registra una più elevata frequenza della malattia, 7 casi per 1000 abitanti, a causa del così detto “effetto fondatore”. Una bassa prevalenza della malattia si registra invece, nelle popolazioni Giapponesi, Cinesi e Africane, con 1 caso ogni 100.000 abitanti. È stato osservato, che le popolazioni con una più elevata prevalenza hanno un numero maggiore di ripetizioni medie di CAG e che le popolazioni dell'Europa Occidentale presentano una

maggior predisposizione genetica all'insorgenza di mutazioni "ex-novo" rispetto alle popolazioni orientali (Squitieri et al., 1994).

2.2 Genetica della MH

La MH è una malattia a trasmissione autosomica dominante. Una persona affetta ha il 50 % di probabilità di trasmettere l'allele mutato ai figli. Il gene responsabile della MH è localizzato sul braccio corto del cromosoma 4 (4p16.3) ed è costituito da 67 esoni. La mutazione è causata da una espansione di triplette CAG (>36) nell'esone 1 del gene, provocando un'espansione ripetuta di poliglutamina (poliQ) all' N-terminale della proteina huntingtina, proteina ubiquitaria, le cui funzioni non sono ancora del tutto chiare (Saudou and Humbert, 2016). Nella maggioranza dei casi, la patologia si manifesta in un'età compresa tra i 40 e i 50 anni, ma vi sono anche casi di esordio giovanile. In linea generale, un numero di triplette tra 10 e 26 è definito normale; un numero di triplette compreso tra 27 e 35 è definito normale ma mutevole (alcuni utilizzano i termini "intermedio", "zona grigia" o "pre-mutazione"); un numero di triplette compreso tra 36 e 39 è definito anormale con penetranza incompleta, è cioè possibile che la malattia non si manifesti allo stesso modo in tutti i soggetti che hanno ereditato questo genotipo; infine, un numero di triplette CAG maggiore di 39, nella maggior parte dei casi tra 42 e 43, è definito anormale e la malattia si presenta con penetranza completa (Ghosh and Tabrizi, 2018). Esiste, inoltre, una relazione inversa tra il numero di ripetizioni della tripletta CAG e l'età di insorgenza della malattia, infatti pazienti con MH giovanile presentano in media un numero di ripetizioni >50 (Andrew et al., 1993). Tuttavia un esordio precoce sembra essere condizionato anche da fattori ambientali e genetici aggiuntivi (Rosenblatt et al., 2006). Caratteristica fondamentale della MH è il fenomeno dell'anticipazione, dovuto ad una instabilità delle ripetizioni CAG durante il processo meiotico, che tendono ad espandersi nel corso delle generazioni, soprattutto se trasmesse attraverso la linea germinale maschile (Kremer et al., 1995). Fenomeno inverso e anche più raro è quello definito contrazione. Mutazioni "de novo" sono presenti nella popolazione Huntington con un'incidenza del 3-10% (Nance, 2017), anche se altri studi hanno dimostrato che le "nuove mutazioni" derivano da un genitore (per lo più paterno) che presenta una espansione di triplette CAG nella cosiddetta zona grigia (Nance, 2017). Molteplici sono i casi di individui che portano la mutazione in omozigosi, con una progressione della malattia più severa (Nance, 2017).

2.3 La proteina Huntingtina

L'huntingtina è una proteina ubiquitaria composta da 3144 amminoacidi, il cui peso molecolare è pari a 348 kDa. La regione N-terminale è stata ampiamente studiata in quanto contiene la coda di poliglutammine (poliQ), che se espansa in maniera anomala costituisce la base eziologica della MH (figura 6). Il tratto N-terminale è preceduto da 17 amminoacidi. Questa regione consiste in una α -elica anfipatica, la cui struttura è implicata nel fenomeno di ritenzione nel reticolo endoplasmatico (Atwal et al., 2007). Segue, poi, un dominio costituito da residui di prolina (PRD). Sia il tratto poliQ che il tratto PRD sono polimorfici nella specie umana. La sequenza di amminoacidi compresa tra le posizioni 69 e 3144 è stata poco caratterizzata e presenta diverse HEAT repeats importanti per le interazioni proteina-proteina (Palidwor et al., 2009). La proteina contiene, infine, una sequenza di esportazione nucleare (NES) a livello del COOH terminale soggetta a diverse modifiche post-traduzionali (Atwal et al., 2007). La localizzazione dell'huntingtina è prevalentemente citoplasmatica, tuttavia è stata rilevata la sua presenza anche nel nucleo cellulare (Sapp et al., 1997).

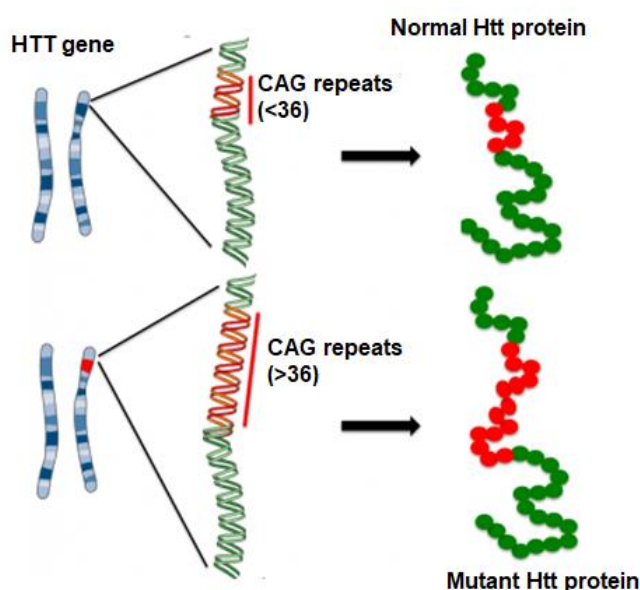


Figura 6. Rappresentazione schematica dell'Huntingtina sana e dell'Huntingtina mutata.

2.4 Le funzioni dell'Huntingtina

La proteina huntingtina (HTT) è sottoposta a proteolisi, in diversi siti, da una varietà di proteasi, alcune delle quali ancora non sono state identificate (Saudou and Humbert, 2016). Le conseguenze fisiologiche di questi tagli della proteina sana ancora non sono del tutto

chiare. L'HTT, inoltre, è sottoposta a diverse modifiche post-traduzionali quali: fosforilazione, acetilazione, ubiquitinazione, sumoilazione e palmoitilazione. Da sottolineare che la fosforilazione dell'HTT in serina 13 e serina 16 promuove la *clearance* dell'HTT mutata riducendone la tossicità, come dimostrato anche dal nostro gruppo (Gu et al., 2009; Thompson et al., 2009; Di Pardo et al., 2012). La funzione fisiologica della proteina è in parte ancora sconosciuta, tuttavia si pensa sia coinvolta in diversi processi.

- È essenziale per lo sviluppo embrionale precoce, infatti topi *knock-out* per l'HTT muoiono tra il settimo e l'ottavo giorno di gestazione, presentando difetti nella gastrulazione, nonostante le manifestazioni cliniche della MH compaiano in età adulta (Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Diversi studi suggeriscono inoltre, che l'HTT sia coinvolta nel processo di neurogenesi, essendo essenziale per la migrazione dei neuroni corticali dalla zona ventricolare alla piastra corticale (Saudou and Humbert, 2016).
- L'HTT interagisce con la dineina e la proteina associata all'HTT (HAP1), controllando il trasporto di vescicole, anterogrado e retrogrado, lungo gli assoni e i dendriti dei neuroni. Tale macchinario molecolare sembra essere coinvolto nel trasporto di autofagosomi, endosomi e lisosomi, vescicole contenenti il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF) e i recettori dell'acido γ -amminobutirrico (GABA) (Saudou and Humbert, 2016).
- L'espressione dell'HTT non è esclusivamente limitata ai neuroni differenziati, essa è abbondantemente espressa anche nelle cellule in divisione, dove l'HTT si localizza ai poli del fuso durante la mitosi (Godin et al., 2010).
- Vi sono evidenze di un coinvolgimento dell'HTT nell'autofagia, in quanto la formazione degli autofagosomi e il loro caricamento è alterato nella MH, causando una ridotta capacità delle cellule di degradare gli aggregati proteici (Martin et al., 2014). Inoltre, l'HTT interagisce con Beclin-1 e LC3 (Saudou and Humbert, 2016).
- La localizzazione nucleare conferisce all'HTT un ruolo chiave nella regolazione trascrizionale (Kegel et al., 2002). È nota, infatti, la sua implicazione nella regolazione trascrizionale del gene che codifica per il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF). Nel citoplasma l'HTT wild-type, infatti, sequestra ed inibisce l'attività del fattore trascrizionale REST/NRSF, il quale modula negativamente la trascrizione del BDNF. È stata dimostrata, sia in un modello murino, sia in pazienti affetti da MH, una perdita della trascrizione del gene BDNF, mediata dall'HTT (Zuccato et al., 2001).

L'HTT è, pertanto, necessaria per la sintesi di BDNF da parte dei neuroni corticali, il quale è rilasciato nello striato (Altar et al., 1997). Si ritiene, dunque, che l'huntingtina mutata

comporti degenerazione striatale a causa della compromissione della produzione corticale di BDNF.

2.5 Neuropatologia della MH

La MH è caratterizzata da una progressiva degenerazione striatale e corticale (figura 7).

È stato sviluppato un sistema di classificazione della patologia, composto da cinque gradi.

- Grado 0: evidenza clinica della MH in assenza di anomalie macroscopiche o microscopiche ad essa correlabili.
- Grado 1: assenza di anomalie macroscopiche nel nucleo caudato o nel putamen, in presenza di una moderata astrocitosi a livello microscopico.
- Grado 2: modificazioni macroscopiche nel nucleo caudato e nel putamen, in assenza di anomalie macroscopicamente rilevabili nel globo pallido.
- Grado 3: presenza di astrocitosi nel segmento laterale del globo pallido, mentre il segmento mediale risulta inalterato.
- Grado 4: il nucleo caudato acquisisce una colorazione giallo-marrone, il corno anteriore del ventricolo laterale è dilatato e il nucleo *accumbens* ha una dimensione ridotta (Vonsattel et al., 1985).



Figura 7. Comparazione di sezioni coronali derivanti da emisfero cerebrale di un paziente con MH e un paziente sano. Paziente sano a sinistra, paziente MH a destra.

2.6 Caratteristiche Cliniche

2.6.1 Disturbi motori

I disordini motori nella MH decorrono seguendo una fase ipercinetica, il cui sintomo preminente è la corea, caratterizzata da piccoli movimenti involontari o incompleti e mancanza di coordinamento ed una successiva fase ipocinetica, caratterizzata da bradicinesia, distonia, disturbi dell'equilibrio e dell'andatura quando la malattia progredisce. Le funzionalità psicomotorie diventano sempre più ridotte con conseguenze anomali quali: alterata espressione del viso, difficoltà nel masticare, nel deglutire e nel parlare. I casi giovanili di MH presentano un decorso sintomatologico diverso, in quanto la malattia progredisce più velocemente (Ghosh and Tabrizi, 2018).

2.6.2 Disturbi cognitivi

I deficit cognitivi sono universali nella MH e possono emergere diversi anni prima della comparsa di altri sintomi. Essi comportano una progressiva compromissione delle funzioni esecutive, quali la pianificazione motoria e verbale e l'abilità a rispondere a cambiamenti improvvisi; inoltre, tendono a comparire alterazioni mnemoniche sia per quanto concerne la memoria a breve termine, sia per quanto concerne la memoria a lungo termine. In alcuni pazienti in fase avanzata di malattia si sviluppa inoltre, una severa demenza frontale e subcorticale (Ghosh and Tabrizi, 2018).

2.6.3 Disturbi psichiatrici

Diversi e numerosi sono i sintomi neuropsichiatrici che si manifestano nella MH, tra i quali: l'apatia, l'ansia, il comportamento ossessivo compulsivo e la psicosi. I disturbi neuropsichiatrici sono comuni anche nella fase pre-sintomatica della patologia (Tabrizi et al., 2009). L'apatia è il disturbo più frequente e, secondo un recente studio che ha reclutato partecipanti sia sintomatici che pre-sintomatici, si manifesta nel 28 % dei soggetti; la depressione, l'irritabilità ed il comportamento ossessivo compulsivo si verificano nel 13% dei pazienti, mentre la psicosi è stata riscontrata nell' 1 % di essi. L'iper e l'ipo-sessualità possono rappresentare un serio disturbo, rispettivamente, in una fase iniziale e tardiva di malattia. Il suicidio inoltre, è un problema estremamente importante in quanto rappresenta la seconda causa di morte nella MH (Ghosh and Tabrizi, 2018).

Altri disturbi che possono presentarsi sono: disturbi del sonno, che alterano in modo importante la qualità della vita del paziente, severa perdita di peso, problemi cardiaci, osteoporosi, atrofia del muscolo scheletrico, problemi endocrini, nonché atrofia testicolare (Ghosh and Tabrizi, 2018).

La morte, in genere, insorge non per la neurodegenerazione in sé, ma per complicanze secondarie.

2.7 MH e Neurosviluppo

La MH è classicamente e correttamente considerata una malattia neurodegenerativa ad insorgenza adulta, tuttavia, diverse evidenze supportano la teoria che un anormale sviluppo del cervello potrebbe avere un ruolo cruciale nell'eziologia della malattia. L'HTT è necessaria per lo sviluppo del cervello e la perdita della sua espressione nei topi è letale a livello embrionale (Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Diversi studi indicano che l'HTT mutata colpisce i *pathway* molecolari dello sviluppo neurale in iPSCs derivanti da pazienti MH (HD iPSC Consortium, 2017). Vi sono inoltre, cambiamenti nel cervello di persone portatrici della mutazione prima dell'insorgere dei sintomi classici della malattia quali, diminuzione del volume intracranico e disordini cognitivi e comportamentali (Nopoulos et al., 2011). Un recentissimo studio ha dimostrato inoltre, che cellule staminali embrionali derivanti da modelli animali di MH presentano un alterato processo di differenziazione in neuroni ed in oligodendrociti (Siebzehnrubl et al., 2018). Da sottolineare due lavori che associano varianti geniche dell'HTT a disordini del neurosviluppo, in particolar modo a fenotipi assimilabili alla Sindrome di Rett, patologia anch'essa rara e classicamente definita come disordine del neurosviluppo (Rodan et al., 2016; Lopes et al., 2016). Tutte queste evidenze supportano l'idea che la MH sia caratterizzata anche da disturbi del neurosviluppo (Humbert, 2010).

3. La Sindrome di Rett

La sindrome di Rett (RTT) è un disordine progressivo del neurosviluppo che colpisce quasi esclusivamente le bambine. Fu riconosciuta per la prima volta da Andreas Rett, un medico australiano, a seguito dell'osservazione casuale nella sala di aspetto di un ospedale di due bambine che mostravano movimenti stereotipati delle mani molto simili tra loro.

La RTT oggi è riconosciuta come la seconda causa di ritardo mentale nelle bambine, con un'incidenza stimata di circa 1/10.000 nati. Nella forma classica, le pazienti mostrano uno sviluppo prenatale normale, ma dopo un periodo di 6-18-24 mesi, le bambine presentano un arresto dello sviluppo seguito da una regressione. In tale fase le pazienti perdono le abilità precedentemente acquisite come l'uso finalistico delle mani e del linguaggio verbale.

Diventa evidente una riduzione delle capacità comunicative e compaiono tratti autistici. Nello stadio successivo, si manifesta un rallentamento della crescita della circonferenza cranica che risulta in microcefalia e conseguentemente si assiste ad una diminuzione della sintomatologia autistica e ad un miglioramento nelle interazioni sociali, nonostante l'incapacità di parlare e le stereotipie persistano, la deambulazione a volte non è più autonoma e si evidenzia l'incapacità di controllo dei movimenti. L'ultimo stadio si manifesta solo dopo i dieci anni ed è caratterizzato da un miglioramento del contatto emotivo, mentre gli attacchi epilettici divengono più controllabili anche se complessivamente la malattia genera molte difficoltà legate a numerosi *handicap* (Chahrour and Zoghbi, 2007).

3.1 Genetica della RTT

La RTT è causata esclusivamente da una mutazione de novo nelle cellule germinali del gene *MECP2* (*methyl CpG binding protein*). Tale gene è associato al cromosoma X e la RTT si presenta nelle femmine che sono eterozigoti per l'allele mutato del gene *MECP2*, mentre i maschi che acquisiscono in emizigosi l'allele mutato sono affetti più severamente e presentano una encefalopatia infantile e tipicamente non sopravvivono all'infanzia. Una delle principali fonti di variabilità fenotipica nelle femmine, deriva dal processo di inattivazione del cromosoma X; perché in esse solo uno dei due cromosomi è attivo in ogni cellula e la scelta del cromosoma X da inattivare è generalmente casuale, per cui la metà delle cellule presenta il cromosoma X materno attivo e l'altra metà presenta il cromosoma X paterno attivo. Pertanto, una femmina con una mutazione nel gene *MECP2* è tipicamente un mosaico, in cui metà delle sue cellule esprimono l'allele *MECP2* wild-type (wt) e l'altra metà esprime l'allele *MECP2* mutante. Tuttavia, talvolta il processo di inattivazione può presentare una preferenzialità nella scelta del cromosoma, il che potrebbe spiegare l'esistenza di rare femmine portatrici asintomatiche (Amir and Zoghbi, 2000; Miltenberger-Miltenyi and Laccone, 2003; Weaving et al., 2005).

In alcuni pazienti RTT a volte possiamo non trovare delle mutazioni nel gene *MECP2*, per cui è stato proposto che ci sia un altro locus responsabile di tale malattia. Sono stati descritti casi in cui il fenotipo della RTT è causato da mutazioni missenso o *frameshift* che conducono ad una proteina tronca, nel gene per la chinasi 5 ciclina-dipendente (*CDLK5*) che è anche nota come serina/treonina protein chinasi 9 ed è mappata nella regione Xp22. È stato suggerito che *CDLK5* e *MECP2* giocano un ruolo comune nei meccanismi patogenetici. Le mutazioni che causano la patologia sono riscontrate nel dominio catalitico e nella regione

COOH. La Cdk5 WT si autofosforila ed è responsabile della fosforilazione di MeCP2. L'espressione di CDLK5 aumenta dopo la nascita e sembra esprimersi prima in quei neuroni che hanno raggiunto la piastra corticale. Le bambine con mutazioni in CDLK5 si distinguono dalla forma classica, oltre che per la precoce insorgenza delle crisi, anche per la mancanza di un periodo di vita normale e quindi di regressione, per la mai acquisita capacità di interazione sociale, mentre appaiono meno gravi problematiche, come iperventilazione, scoliosi e disturbi del sistema autonomo (Fehr et al., 2013).

Recentemente è stato identificato un terzo gene coinvolto nella sindrome di RTT, il gene FOXP1 che mappa nella regione cromosomica 14q12. FOXP1 codifica per un fattore di trascrizione, la proteina "forkhead-box-G1- protein", che si esprime nei neuroni corticali in differenziazione e maturi del cervello fetale ed adulto. Il fenotipo clinico delle pazienti con mutazioni in FOXP1 è caratterizzato da un periodo perinatale con una grave ipotonia, microcefalia prima dei 4 mesi, regressione entro i 6 mesi, assenza dell'uso delle mani e del linguaggio e stereotipie delle mani tipiche della RTT, grave ritardo cognitivo, ipoplasia del corpo calloso, movimenti costanti della lingua, mentre l'epilessia non è molto presente (Ariani et al., 2008).

3.2 MeCP2 (methyl CpG binding protein)

Il gene MECP2 mappa nel locus Xq28, è costituito da quattro esoni ed è localizzato sul cromosoma X. La maggior parte delle mutazioni in MECP2 avvengono *de novo*; circa il 67% di tutte le mutazioni di MECP2 sono causate dalla transizione C/T di 8 dinucleotidi CpG, localizzati tra il terzo e quarto esone; inoltre i cambiamenti comprendono sostituzioni nucleotidiche missenso e nonsenso e piccoli o estesi riarrangiamenti quali, inserzioni e delezioni (Ravn et al., 2005; Archer et al., 2006;), da cui derivano proteine tronche, instabili o funzionalmente inattive. Tuttavia sembra che le mutazioni troncanti precoci siano associate a fenotipi più gravi rispetto alle mutazioni missenso, mentre le delezioni C-terminali sono associate a fenotipi più lievi (Smeets et al., 2005). La proteina MeCP2, consta di 486 amminoacidi e contiene quattro differenti domini: 1) il dominio di legame alle isole CpG metilate (MBD o methyl CpG binding domain, 85 aa) che lega al 5' le citosine metilate (*island CpG*) con un'alta affinità; 2) un dominio di repressione trascrizionale (TRD o Transcriptional Repression Domain, 104 aa) che interagisce con l'istone deacetilasi e con il corepressore SIN3A; 3) il segnale di localizzazione nucleare (NLS o Nuclear Localization Signal) che è responsabile del trasporto di MeCP2 nel nucleo e 4) il segmento al C-terminale,

contenente un dominio WW, che facilita il legame al core del nucleosoma. Le interazioni tra il macchinario della repressione trascrizionale e la proteina MeCP2 che lega la cromatina conduce alla deacetilazione del core istonico H3 e H4 mediata dalle istone deacetilasi, portando alla compattazione della cromatina, rendendola così meno accessibile ai componenti necessari alla trascrizione.

MeCP2 è espressa ubiquitariamente in tutti i tessuti ed agisce globalmente come un repressore trascrizionale.

Il gene MECP2 codifica per due diverse isoforme della proteina, prodotte per splicing alternativo dell'esone 2 (Figura 8). Le varianti di splicing di MECP2 differiscono solo nelle loro porzioni N-terminali: l'isoforma più abbondante e leggermente più lunga, MeCP2B (conosciuta anche come MeCP2-e1 o MeCP2 α) contiene 24 aminoacidi codificati dall'esone 1, che contiene il sito di inizio della traduzione, e manca dei 9 aminoacidi codificati dall'esone 2, mentre il sito di inizio della traduzione per l'isoforma MeCP2A (conosciuta anche come MeCP2-e2 o MeCP2 β) è nell'esone 2 (Kriaucionis and Bird, 2004; Mnatzakanian et al., 2004; Dragich et al., 2007). Inoltre MECP2 possiede un'ampia regione molto conservata, all'estremità 3'-UTR, che contiene siti multipli di poliadenilazione che possono essere utilizzati alternativamente per generare quattro diversi trascritti. Sebbene entrambe le isoforme siano altamente espresse nel cervello, esse differiscono nell'efficienza traduzionale e sono espresse a livelli diversi in vari tessuti: MeCP2B è più abbondante nel cervello, nel timo, nell'intestino e durante il differenziamento neuronale (Kriaucionis and Bird, 2004)

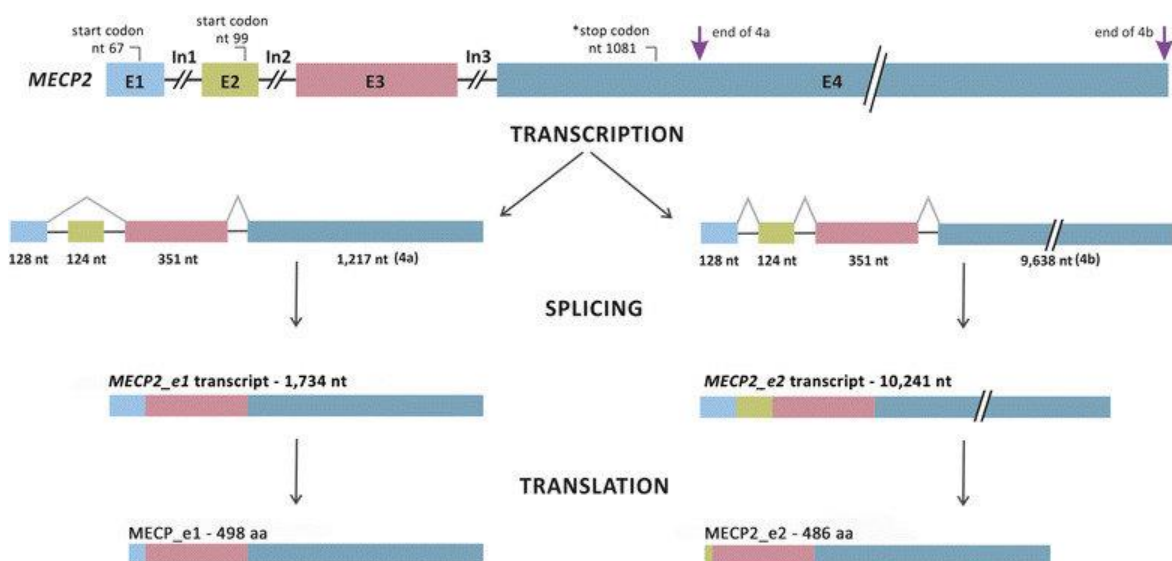


Figura 8. Struttura del gene MECP2 e dei suoi prodotti proteici. Il gene è costituito da 4 esoni e due varianti di splicing che differiscono nell'estremità N- terminale: MeCP2-e1 è costituita da 498 amminoacidi mentre MeCP2-e2 da 486 amminoacidi. Il dominio MBD è in verde, il TRD in porpora, il segnale di localizzazione nucleare in arancio e il dominio WW in giallo. L'estremità 3'UTR è in nero e il tratto di polyA in rosso.

3.3 MeCP2 ed il Controllo dell'Espressione Genica

La proteina MeCP2 è stata caratterizzata inizialmente come repressore trascrizionale sulla base di esperimenti condotti in vitro, infatti MeCP2 lega principalmente loci eterocromatici (Bird, 1995).

Il modello classico di funzionamento di MeCP2 (Figura 9a) prevede il suo legame ai promotori metilati dei geni bersaglio ed il reclutamento del corepressore SIN3A e dei complessi di deacetilasi istoniche HDAC1 e 2 mediato dal TRD (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998), determinando un rimodellamento della cromatina che limita l'accesso del macchinario trascrizionale, fenomeno che porta al silenziamento dei geni coinvolti (Jones et al., 1998;). E' inoltre emerso che i promotori dei geni regolati positivamente da MeCP2 e legati da esso, sono contemporaneamente legati anche dall'attivatore trascrizionale CREB1 (Figura 9b). MeCP2 è anche responsabile del silenziamento di loci sottoposti ad *imprinting* mediante l'induzione della formazione di strutture di ordine superiore di cromatina (*loops*) associate a silenziamento trascrizionale (Figura 9d, Horike et al., 2005). Queste strutture potrebbero influenzare le interazioni tra promotore ed *enhancer*, o agire come un *insulator* tra differenti stati cromatinici (Chadwick and Wade 2007).

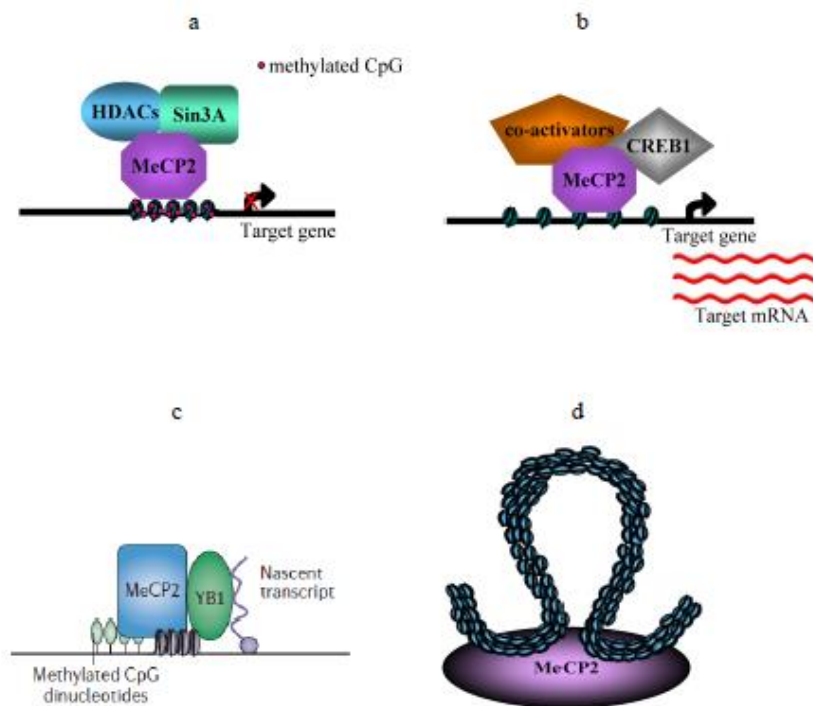


Figura 9. (a) MeCP2 media la repressione trascrizionale; (b) MeCP2 attiva la trascrizione quando recluta il fattore CREB1; (c) MeCP2 regola lo splicing alternativo interagendo con YB1; (d) MeCP2 è responsabile del silenziamento di loci sottoposti ad imprinting formando un loop di cromatina silente (Della Ragione F. et al., 2012).

Evidenze recenti attribuiscono a MeCP2 anche un ruolo di attivatore della trascrizione. Analisi di microarray di espressione condotti su ipotalamo e cervelletto di topi con fenotipo nullo o con una aumentata espressione di MeCP2, hanno evidenziato cambiamenti dei livelli di espressione di centinaia di geni, la maggioranza dei quali (circa l'85%) risulta essere attivato da MeCP2 (Chahrour et al., 2008; Ben Shachar et al., 2009). Tali dati suggeriscono che, almeno in alcuni distretti cerebrali, MeCP2 può agire da attivatore trascrizionale per alcuni geni e da repressore per altri, probabilmente in dipendenza del partner molecolare con cui esso interagisce (Chahrour et al., 2008). MeCP2 avrebbe un'ulteriore funzione nella modulazione dello *splicing*, mediante l'interazione con la proteina YB1 (figura 9c), a sua volta coinvolta nel processamento dell'mRNA. Infatti, nei neuroni che mancano di MeCP2, è stata riscontrata un'alterazione nello *splicing* dei trascritti nascenti che genera mRNA aberranti (Young et al., 2005).

3.4 Quadro Clinico della Sindrome di Rett

3.4.1 Fase 1: tra i 6 e 18 mesi

Rallentamento dello sviluppo psicomotorio fino a quel momento normale. Compare disattenzione verso l'ambiente circostante e verso il gioco. Irrompono i primi sporadici stereotipi delle mani. Rallenta la crescita della circonferenza cranica.

3.4.2 Fase 2: dai 18 mesi ai 3 anni

Rapida regressione dello sviluppo, perdita delle capacità acquisite, irritabilità, insonnia, disturbo dell'andatura. Compaiono manifestazioni di tipo autistico, perdita del linguaggio espressivo e dell'uso funzionale delle mani accompagnata dai movimenti stereotipati e comportamenti autolesivi. La regressione può essere lenta o graduale.

3.4.3 Fase 3: stadio pseudo stazionario

Dopo la fase di regressione, lo sviluppo si stabilizza. Diminuiscono gli aspetti di tipo autistico e viene recuperato il contatto emotivo con l'ambiente circostante. Frequenti gli attacchi epilettici.

3.4.4 Fase 4: all'incirca dopo 10 anni

Migliora il contatto emotivo. Gli attacchi epilettici sono più controllabili. La debolezza, l'atrofia, la spasticità e la scoliosi impediscono a molte ragazze di camminare, anche se non mancano le eccezioni.

4. DISFUNZIONI GLICO-LIPIDICHE NELLA MH E NELLA RTT

4.1 MH

Tra le tante disfunzioni cellulari che caratterizzano la MH, un alterato metabolismo dei glico-sfingolipidi sembra avere un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia. Negli ultimi 10 anni, il nostro gruppo ha contribuito a dimostrare che l'alterazione del metabolismo dei gangliosidi è un evento chiave nell'eziopatogenesi della malattia e che tale metabolismo può rappresentare un efficace bersaglio terapeutico. In particolar modo, è stata dimostrata una alterazione dei livelli di GM1, GD1a e GT1b nello striato, nella corteccia e nel corpo calloso di modelli preclinici di malattia, già in fase pre-sintomatica, ed una diminuzione dei livelli di GM1 in fibroblasti di pazienti (Maglione et., 2010; Di Pardo et al., 2016). Tale alterazione sembrerebbe dipendere da un'alterata espressione genica degli enzimi coinvolti nella sintesi dei gangliosidi quali: St3gal5 o GM3 sintasi, B4galnt1 o GM2 sintasi, B3galt4 o GM1 sintasi (Maglione et., 2010). La somministrazione di GM1 esogeno ripristina i suoi normali livelli endogeni in diversi modelli di MH, promuovendo l'attivazione di AKT e la fosforilazione dell'HTT mutata, diminuendone così la tossicità ed esercitando un importante effetto terapeutico sulla sintomatologia nel modello murino YAC128 (Di Pardo et al., 2012; Alpaugh et al., 2017).

L'alterazione del metabolismo dei glico-sfingolipidi ha un ruolo chiave nella fisiopatologia dell'MH, infatti, recentemente, abbiamo dimostrato che la MH è caratterizzata anche da un aberrante metabolismo degli sfingolipidi semplici (Di Pardo et al., 2017 a e b). In particolar modo, abbiamo dimostrato che la sfingosina-1-fosfato (S1P), uno dei più importanti lipidi bioattivi, fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare è ridotta nel modello murino R6/2. Inoltre, i nostri dati indicano che l'espressione degli enzimi che metabolizzano S1P, SGPL1 o S1P liasi, SPHK1 e 2 o S1P chinasi 1 e 2, è alterata in due modelli preclinici, YAC128 e R6/2, e nel cervello post-mortem di pazienti MH (Di Pardo et al., 2017). Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato, inoltre che la somministrazione di molecole S1P mimetiche, FTY720 (fingolimod) e A971432 (agonista selettivo del recettore 5 di S1P) esercitano un notevole effetto terapeutico sulla sintomatologia nel modello murino R6/2 (Di Pardo et al., 2014; Di Pardo et al., 2017). Da sottolineare come FTY720 ristabilizza i normali livelli del ganglioside GM1 nei topi trattati, evidenziando un link già esistente tra il metabolismo degli sfingolipidi e quello dei gangliosidi e supportando l'idea che il metabolismo dei glico-sfingolipidi rappresenti un efficace bersaglio terapeutico.

4.2 RTT

La RTT è caratterizzata tra l'altro da un'alterata omeostasi lipidica. Evidenze scientifiche mostrano infatti, una alterata sintesi del colesterolo nel cervello di topi *Mecp2^{Bird}* e un incremento dello stesso nel siero di pazienti RTT. Inoltre, sembra che la proteina MeCP2 regoli il metabolismo lipidico attraverso l'interazione con il complesso NCoR1/SMRT-HDAC3 (Kyle et al., 2018). Anche se non in maniera esaustiva e definitiva, due lavori hanno individuato una alterazione dei livelli dei gangliosidi in pazienti RTT e in modelli murini. In particolar modo, i ricercatori hanno individuato una diminuzione significativa di GD1a e GT1b ed un aumento di GM1 nel liquido cerebrospinale di pazienti RTT (Lekman et al., 1999), e una diminuzione significativa di GD1a nel tronco cerebrale di topi *Mecp2^{Bird}* (Seyfried et al., 2009). Più recentemente, varianti geniche di ST3GAL5, GM3 sintasi, sono state associate a fenotipi riconducibili alla RTT quali: alterazione dello sviluppo motorio ed epilessia (Lee et al., 2016).

5. IPOTESI e SCOPO DEL LAVORO

I sialo-glico-coniugati, molecole lipidiche e proteiche contenenti acido sialico, rappresentano una componente fondamentale del SNC essendo implicate nella trasduzione del segnale, nell'interazione cellula-cellula, nello sviluppo del cervello e nella sinaptogenesi. Infatti, un alterato metabolismo dei sialo-glico-coniugati rappresenta una caratteristica patologica associata a diverse malattie neurologiche, sia neurodegenerative che del neurosviluppo. Chiarire ulteriormente la biologia dei sialo-glico-coniugati ed il loro ruolo nelle malattie neurologiche potrebbe aiutarci a comprendere i meccanismi comuni a processi neuro-disfunzionali e neurodegenerativi e quelli esclusivi a ciascuna condizione, allo scopo di sviluppare approcci terapeutici mirati e condivisi.

Essenzialmente durante il mio percorso di dottorato ho concentrato la mia attenzione sulla malattia di Huntington (MH).

La MH è una malattia genetica rara e neurodegenerativa, caratterizzata da un complesso profilo patogenetico i cui meccanismi non sono ancora del tutto chiari. Negli ultimi anni il nostro gruppo ha contribuito a dimostrare che l'alterazione del metabolismo dei gangliosidi, glico-sfingolipidi contenenti acido sialico, è un evento chiave nell'eziopatogenesi della malattia e che tale metabolismo può rappresentare un efficace bersaglio terapeutico.

Considerando che alcune sialiltransferasi sono coinvolte sia nel metabolismo dei glicolipidi che in quello delle glicoproteine, noi ipotizziamo che l'alterazione del metabolismo dei gangliosidi nella MH possa rappresentare solo una delle componenti di una disfunzione più grande correlata ad una generale alterazione dei sialo-glico-coniugati.

Al fine di valutare se anche il metabolismo delle glicoproteine fosse alterato nella MH e potesse essere coinvolto nell'eziopatogenesi della stessa, ho analizzato i livelli di acido polisialico (polySia), uno zucchero che lega esclusivamente le proteine, nel topo transgenico R6/2 a differenti stadi di malattia. Inoltre ho analizzato i livelli di espressione genica delle due sialiltransferasi, ST8Sia2 e ST8Sia4, coinvolte esclusivamente nella sintesi di polySia. Tenuto conto del cruciale ruolo che i sialo-glico-coniugati e l'HTT hanno nello sviluppo embrionale ho eseguito l'analisi dei livelli di polySia in embrioni di topi R6/2 al quindicesimo giorno di gestazione (E15). L'evidenza di un precoce sbilanciamento di tale metabolismo aprirebbe nuovi scenari che permetterebbero di riformulare la classica definizione di MH ed evidenziare aspetti legati al neurosviluppo finora solo ipotizzati.

Inoltre, allo scopo di approfondire aspetti esclusivamente e potenzialmente legati al solo neurosviluppo, ho intrapreso studi in un modello pre-clinico di RTT, in collaborazione con

il dottor Maurizio D'Esposito, patologia rara classicamente definita come disordine del neurosviluppo.

Varianti geniche del gene *ST3GAL5*, codificante per la GM3 sintasi, enzima chiave nella sintesi dei gangliosidi, sono state associate a fenotipi riconducibili alla RTT; inoltre la proteina MeCP2 è implicata nella regolazione del metabolismo lipidico.

Alla luce di queste evidenze, ho valutato i livelli dei gangliosidi GM1, GD1a e GT1b e l'espressione genica di alcuni enzimi coinvolti in tale metabolismo quali: *ST3GAL5*, *B3GALT4* (GM1 sintasi), *ST3GAL2* (GD1a sintasi) e *NEU1*.

6. MATERIALI E METODI

6.1 Modelli Animali

Tutte le procedure sugli animali sono state approvate dall'IRCCS Neuromed *Animal Care Review Board* e dall'Istituto Superiore di Sanità (numero di permesso: 1163/2015-PR) e sono state condotte secondo la Direttiva UE 2010/63/UE per gli esperimenti sugli animali.

Modello R6/2.

(B6CBA-Tg(HDexon1)62Gpb/1J) Il modello murino transgenico R6/2, over-esprime l'esone 1 umano del gene HTT con espansioni ripetute di 160 ± 10 (CAG), rappresenta uno dei modelli animali meglio caratterizzati e più utilizzati per gli studi preclinici sulla MH. E' caratterizzato da una precoce insorgenza dei sintomi, quali disturbi motori e da una rapida progressione della malattia. I deficit motori compaiono a partire dalla sesta settimana di età, progredendo in modo ingravescente fino alla morte che normalmente avviene intorno alla dodicesima settimana di età. La caratteristica più importante di questo modello è quella di avere fasi ben distinte della malattia: fase pre-sintomatica (4 settimane di età), fase iniziale di malattia (6 settimane di età) e fase avanzata di malattia (11 settimane di età) (figura 10) (Mangiarini et al., 1996; Carter et al., 1999).

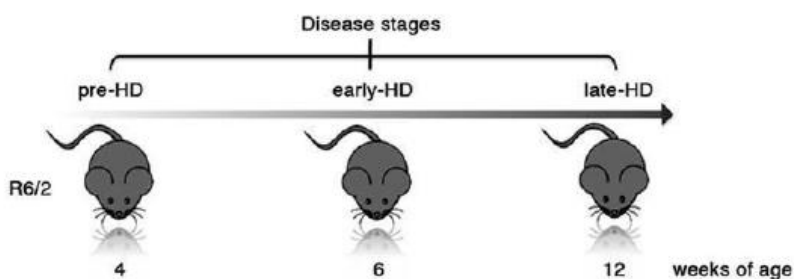


Figura 10. Rappresentazione schematica dei tre stadi di malattia della MH (Di Pardo et al., 2017).

Modello *Mecp2^{Bird}*.

(B6.129P2(C)-*Mecp2*tm1.1Bird/J) Il modello murino *Mecp2^{Bird}*, knock-out per l'esone 3 e l'esone 4 del gene *Mecp2*, rappresenta il primo modello murino di RTT descritto in letteratura. I maschi emizigoti appaiono fenotipicamente normali fino alla terza settimana di età; da allora in poi compaiono i primi disturbi motori, quali: andatura non coordinata e riduzione dei movimenti spontanei. La progressione variabile dei sintomi motori, a cui si aggiunge una difficoltà respiratoria, avviene tra la quarta e la settima settimana di età

comportando una repentina perdita di peso e morte intorno la decima settimana di età (Guy et al., 2001; Ricceri et al., 2008).

6.2 Somministrazione di Farmaci in Vivo

POCME (1-O-(3-O-beta-D-glucopyranosylbutyryl) pancratistatin) e F-NANA (Methyl 5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-3-fluoro-D-erythro- β -L-manno-2-nonulopyranosate), sintetizzati dal dottor Thomas J Boltje dell'Università di Radboud, sono stati disciolti in DMSO (dimetilsolfossido), diluito in soluzione salina (veicolo) e somministrato quotidianamente per iniezione intra-nasale (figura11) alla concentrazione di 100 e 50 μ M, rispettivamente, per 12 giorni, a partire dalla quinta settimana di età. I topi di controllo sono stati trattati con lo stesso volume di veicolo contenete DMSO.



Figura11. Rappresentazione fotografica della procedura di somministrazione intranasale del farmaco.

6.3 Western Blot

Tutti gli animali, a diverse fasi di malattia, sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale. I tessuti dissezionati, e subito congelati in azoto liquido, sono stati omogeneizzati in *Lysis buffer* così costituito: 20 mM Tris, ph 7,4, 1% NP40, 1mM EDTA, 20 mM NaF, 2mM Na₃ VO₄ e una miscela di inibitori di proteasi (Santa Cruz, Cat. N. sc-29131). La concentrazione delle proteine è stata determinata con il metodo Bradford (Bio-Rad Laboratories). Gli estratti proteici sono stati corsi su gel 8% SDS-PAGE caricando 20 μ g di proteine. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati: Polysialic acid Rabbit, 1:1000, MyBioSource, β -actina Mouse, 1:2000, Cell Signaling, Biotinylated Sambucus Nigra Lectin (SNA), 1:1000, Vector Labs e Biotinylates Maackia Amurensis Lectin II (MAL II), 1:500, Vector Labs. L'anticorpo anti β -actina è stato utilizzato come riferimento per normalizzare

i risultati. Dopo i lavaggi in TBS-Tween si è successivamente incubato con un anticorpo secondario specifico (goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated Calbiochem; goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated Calbiochem) per 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state incubate con Amersham ECL Prime Detection Reagent (GE Healthcare) e i segnali sono stati visualizzati e quantificati con il software Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

6.4 Dot-Blot

Per l'analisi dei livelli dei gangliosidi, i lisati proteici sono stati ri-quantificati al Nanodrop 2000c (Thermo Scientific), per assicurarsi che venisse analizzata la stessa quantità di omogenato proteico. I campioni proteici sono stati *spottati* su una membrana di nitrocellulosa e l'analisi di *dot-blotting* è stata eseguita come precedentemente descritto in *Di Pardo et al., 2016*. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati: HRP-conjugated cholera toxin subunit B o GM1 (1:2000) Invitrogen C34780, GD1a (1:1000) Millipore MAB5606 e GT1b (1:1000) Millipore MAB5608. Per GD1a e GT1b è stato utilizzato l'anticorpo secondario goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated Calbiochem. Le membrane sono state incubate con Amersham ECL Prime Detection Reagent (GE Healthcare) e i segnali sono stati visualizzati e quantificati con il software Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

6.5 Estrazione di RNA da tessuto e Real-Time-PCR

I tessuti dissezionati sono stati omogeneizzati in TRIZOL[®] Reagent (Total RNA Isolation Reagent, Life Technologies); l'RNA estratto tramite la tecnica fenolo-cloroformio è stato quantificato con il Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). La retrotrascrizione è stata eseguita su 1µg di RNA totale trattato con DNasi mediante l'utilizzo del Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Gli esperimenti di PCR *Real Time* sono stati condotti mediante l'utilizzo di una macchina CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). I cDNA risultanti sono stati amplificati utilizzando Power SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) seguendo le istruzioni del produttore ed utilizzando i seguenti primer: mST8Sia2 (Fwd: 5'-CTC TCT GAG GAT CAG GAA GCA AA-3'; Rev: 5'-AAT AAT GTC TCC AGG CTT CAG GG), mST8Sia4 (Fwd: 5'-GGA GAT GGT GAA CTG TGT TTG AG-3'; Rev: 5'-ACA GAA TGT TGG AAG ATG GTG GAG-3'), mST3Gal2 (Fwd: 5'-CTG CTC TTC ACC TAC TCG CAC-3'; Rev: 5'-GCT GTA GTC CTG AAT AGC CTG G-3'), mB3Galt4 (Fwd: 5'-TCT

GGA CCC TGT TTG GAC CTT-3'; Rev: 5'-GGC CGT ACA CAC CAG GAT G-3'), ST3Gal5 (Fwd: 5'-AGT CCC ACT CCA GCC AAA G-3'; Rev: 5'-CCA AGA CAA CGG CAA TGA C-3'), mNeu1 (Fwd: 5'-TTC ATC GCC ATG AGG AGG TCC A-3'; Rev: 5'-AAA GGG AAT GCC GCT CAC TCC A-3'). L'espressione genica degli enzimi oggetto di studio è stata normalizzata su Ciclofillina A utilizzando i seguenti primer: mCypA (Fwd: 5'-GAG CTG TTT GCA GAC AAA-3'; Rev: 5'-CCC TGG CAC ATG AAT CCT GG-3').

6.6 Analisi Statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software). I dati sono espressi come media \pm SD. La soglia di significatività è stata fissata a $p < 0,05$.

7. RISULTATI

7.1 I Livelli di PolySia sono Ridotti nel Modello di MH R6/2 in Fase Avanzata di Malattia

Un alterato metabolismo dei glicolipidi, sia dei livelli dei gangliosidi che degli enzimi coinvolti nella sintesi degli stessi, è stato precedentemente descritto in modelli di MH (Maglione et al., 2010; Di Pardo et al., 2016). Considerando che, alcune sialiltransferasi, sono coinvolte sia nella sintesi dei gangliosidi che nella sintesi delle glicoproteine, noi ipotizziamo che l'alterazione dei sialo-glico-coniugati possa coinvolgere anche le glicoproteine. A tale scopo, ho analizzato i livelli di polySia in striato, corteccia, ed ippocampo, in quanto regioni cerebrali maggiormente colpite dalla malattia ed in cui lo stesso polySia svolge un ruolo chiave per la corretta omeostasi, del modello murino R6/2, in fase avanzata di malattia. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa di polySia nelle diverse aree del cervello analizzate, in fase avanzata di malattia (figura 12), supportando l'ipotesi che la MH sia caratterizzata anche da un alterato metabolismo delle glico-proteine.

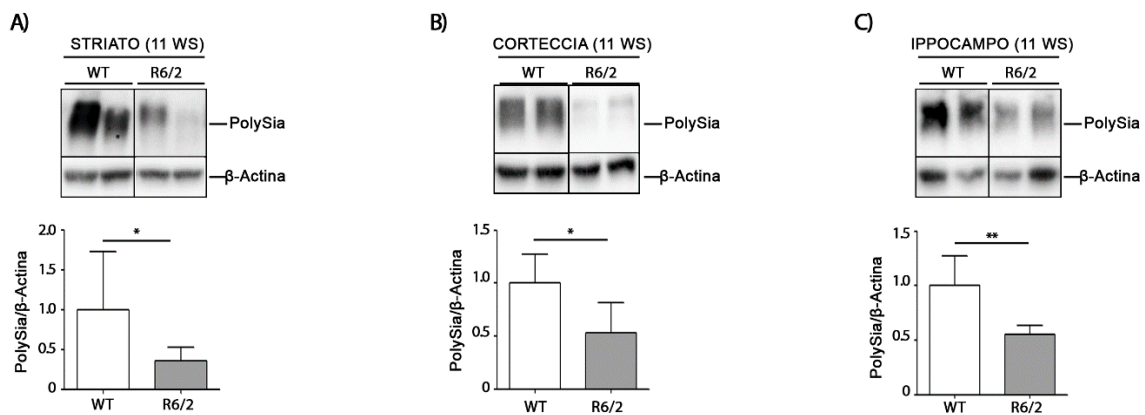


Figura 12. I livelli di polySia sono ridotti nel cervello di topi R6/2 in fase avanzata di malattia. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di polySia in striato (A) corteccia (B) e ippocampo (C) in topi R6/2 in fase avanzata di malattia e WT. In ogni *immunoblotting*, tutti i campioni sono stati corsi sullo stesso gel; campioni non adiacenti sono separati da una linea nera. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. (*Unpaired t-test*).

7.2 I Livelli di PolySia sono Alterati nel Modello di MH R6/2 in Fase Iniziale di Malattia

Al fine di valutare se l'alterazione delle glicoproteine potesse rappresentare un evento biologico precoce, importante per l'eziopatogenesi della malattia stessa, ho analizzato i livelli di polySia in striato, corteccia ed ippocampo del modello murino R6/2 in fase iniziale di malattia (6 settimane di età). I risultati ottenuti mostrano una riduzione significativa di polySia in striato ed un aumento significativo dello stesso in corteccia ed ippocampo nel modello R6/2 rispetto ai controlli (figura 13). I dati ottenuti indicano una alterazione globale dei livelli di polySia già in fase iniziale di malattia.

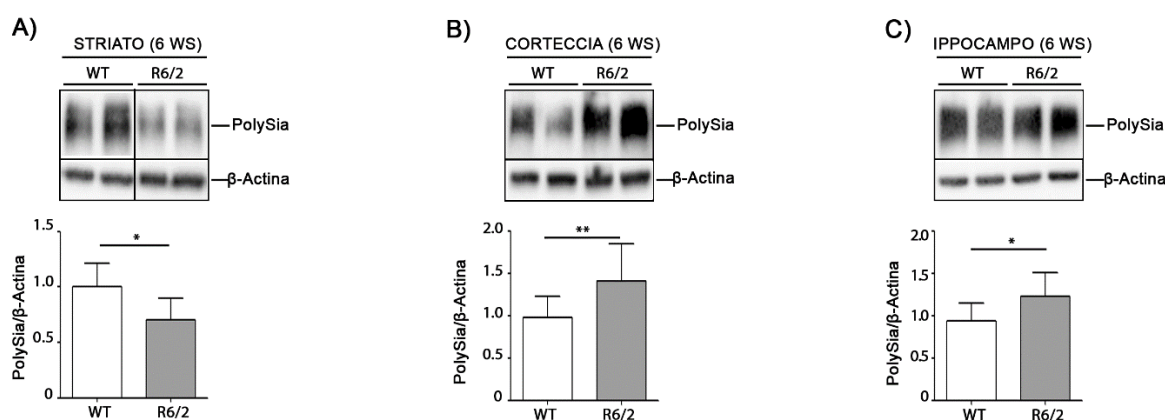


Figura 13. I livelli di polySia sono alterati nel cervello di topi R6/2 in fase iniziale di malattia. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di polySia in striato (A) corteccia (B) e ippocampo (C) in topi R6/2 in fase iniziale di malattia e WT. In ogni *immunoblotting*, tutti i campioni sono stati corsi sullo stesso gel; campioni non adiacenti sono separati da una linea nera. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=7/9 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. (*Unpaired t-test*).

7.3 I Livelli di PolySia sono Alterati nel Modello di MH R6/2 in Fase Presintomatica di Malattia

Al fine di valutare se l'alterazione delle glicoproteine potesse rappresentare un evento biologico che precede la comparsa di qualsiasi sintomo fenotipicamente rilevabile ho analizzato i livelli di polySia in striato, corteccia ed ippocampo del modello murino R6/2 in fase presintomatica di malattia (4 settimane di età). I risultati ottenuti mostrano un aumento significativo di polySia in striato ed in corteccia ed una tendenza all'aumento, non significativa, in ippocampo nel modello R6/2 rispetto ai controlli (figura 14). L'alterazione

dei livelli di polySia anche nelle fasi precoci di malattia sottolinea l'importanza del metabolismo dei sialo-glico-coniugati nell'eziopatogenesi della MH.

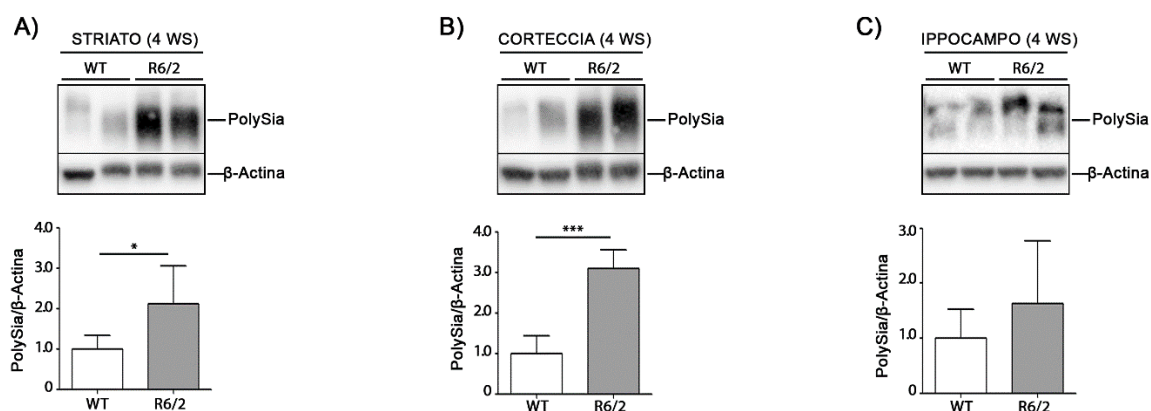
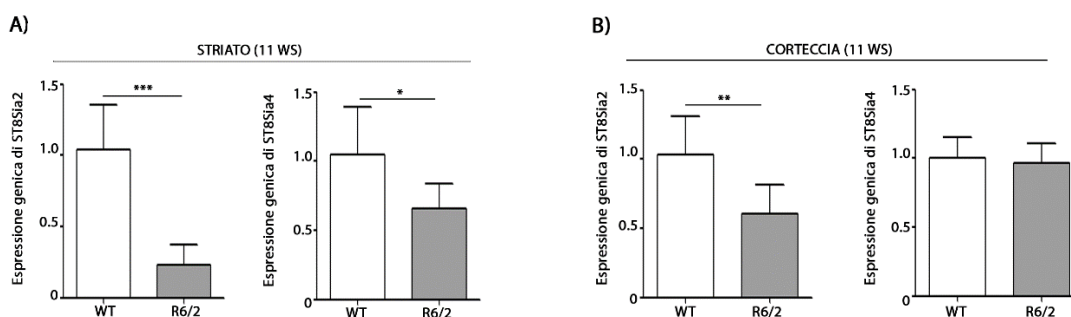


Figura 14. I livelli di polySia sono alterati nel cervello di topi R6/2 in fase presintomatica di malattia. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di polySia in striato (A) corteccia (B) e ippocampo (C) in topi R6/2 in fase presintomatica di malattia e WT. In ogni *immunoblotting*, tutti i campioni sono stati corsi sullo stesso gel; campioni non adiacenti sono separati da una linea nera. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, p<0.05; ***, p<0.0001. (*Unpaired t-test*).

7.4 I Livelli di mRNA, di ST8Sia2 e ST8Sia4, sono Ridotti nel Modello di MH R6/2 in Fase Avanzata di Malattia

Considerando che la sintesi di polySia è esclusivamente effettuata da due sialiltransferasi, ST8Sia2 e ST8Sia4, ho analizzato i livelli di espressione genica di questi ultimi in striato, corteccia ed ippocampo del modello murino R6/2 in fase avanzata di malattia. I risultati ottenuti mostrano una significativa diminuzione di ST8Sia2 in tutte le aree analizzate ed una diminuzione di ST8Sia4 nello striato in fase avanzata di malattia (figura 15). I dati di espressione genica supportano i dati ottenuti sui livelli di polySia indicando, inoltre, che lo striato rappresenta la regione maggiormente colpita nella MH.



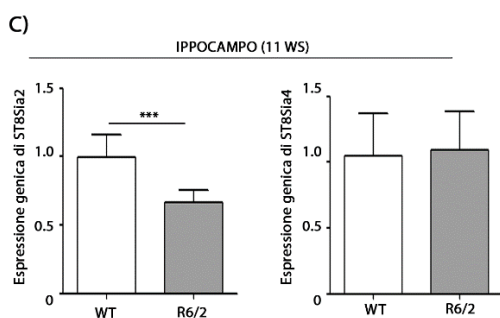
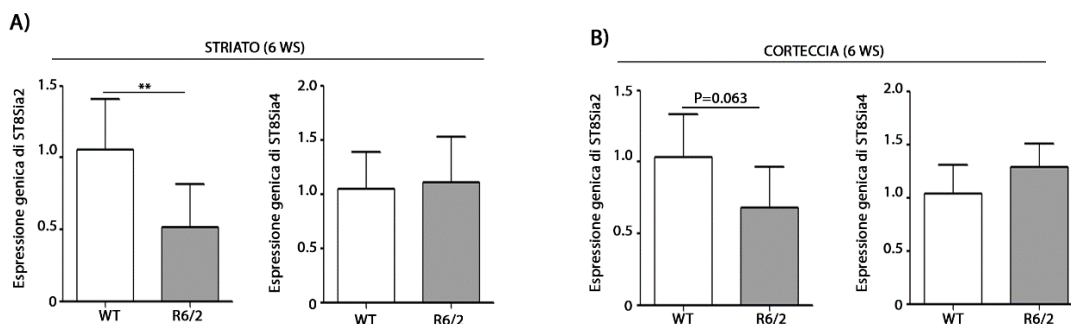


Figura 15. L'espressione genica degli enzimi ST8Sia2 e ST8Sia4 è ridotta nel cervello di topi R6/2 in fase avanzata di malattia. Analisi dell'espressione genica di ST8Sia2 e ST8Sia4 in striato (A) corteccia (B) e ippocampo (C) in topi R6/2 in fase avanzata di malattia e WT. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$. (*Unpaired t-test*).

7.5 I Livelli di mRNA di ST8Sia2 sono Ridotti nel Modello di MH R6/2 in Fase Iniziale di Malattia

Considerando che la variazione di polySia è già presente in fase iniziale di malattia, ho analizzato i livelli di ST8Sia2 e ST8Sia4 nella medesima fase in striato, corteccia ed ippocampo al fine di valutare se la variazione di polySia potesse coincidere con una variazione delle due sialiltransferasi. I dati ottenuti mostrano una diminuzione significativa di ST8Sia2 in striato ed ippocampo ed una tendenza, non significativa, a diminuire in corteccia (figura 16). Non ho osservato alcuna variazione dell'espressione genica di ST8Sia4 in nessuna area analizzata. L'alterazione dell'espressione genica di St8Sia2 rappresenta, quindi, un evento biologico precoce nella MH.



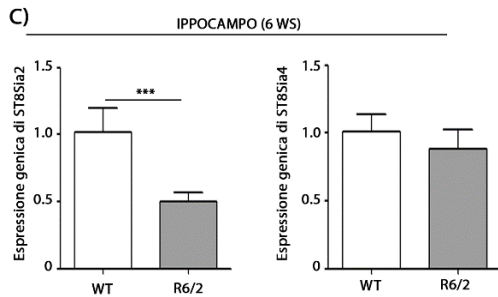
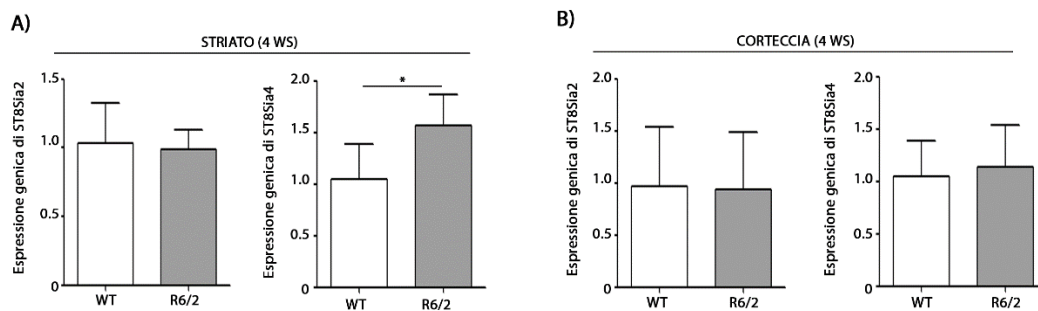


Figura 16. L'espressione genica dell'enzima ST8Sia2 è ridotta nel cervello di topi R6/2 in fase iniziale di malattia. Analisi dell'espressione genica di ST8Sia2 e ST8Sia4 in striato (A) corteccia (B) e ippocampo (C) in topi R6/2 in fase iniziale di malattia e WT. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$. (*Unpaired t-test*).

7.6 I Livelli di mRNA di ST8Sia4 sono Aumentati nel Modello di MH R6/2 in Fase Presintomatica di Malattia

Come descritto precedentemente, la variazione di polySia è presente già in fase presintomatica di malattia, al fine quindi di valutare se anche l'espressione genica di ST8Sia2 e ST8Sia4 potesse essere alterata, ho analizzato i livelli dei due enzimi in striato, corteccia ed ippocampo. I dati ottenuti mostrano un aumento significativo di ST8Sia4 nello striato in fase presintomatica di malattia (figura 17). L'alterata espressione genica degli enzimi coinvolti nella sintesi di polySia anche nelle fasi precoci di malattia supporta l'idea che il metabolismo dei sialo-glico-coniugati sia coinvolto nell'eziopatogenesi della MH.



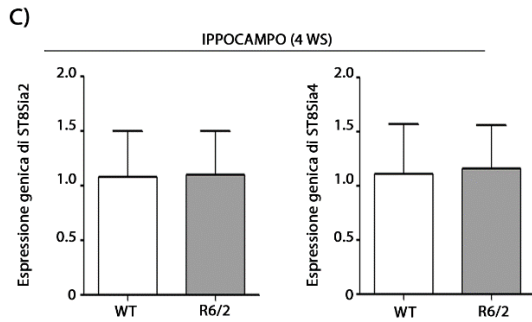


Figura 17. L'espressione genica dell'enzima ST8Sia4 è aumentata nello striato di topi R6/2. Analisi dell'espressione genica di ST8Sia2 e ST8Sia4 in striato (A) corteccia (B) e ippocampo (C) in topi R6/2 in fase presintomatica di malattia e WT. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.0001$. (*Unpaired t-test*).

7.7 I Livelli di PolySia sono Alterati in Embrioni di Topi MH

Considerando il ruolo cruciale di polySia e della proteina HTT durante lo sviluppo embrionale e allo scopo di verificare quanto precoce potesse essere l'alterazione del metabolismo delle glico-proteine ho analizzato i livelli di polySia in embrioni di topi R6/2 al quindicesimo giorno di gestazione (E15). I risultati ottenuti mostrano un aumento dei livelli di polySia nel cervello di embrioni MH rispetto ai controlli (figura 18) evidenziando un precoce sbilanciamento, addirittura sin dall'embriogenesi, del metabolismo dei sialo-glico-coniugati nella malattia. Ulteriori studi sono in corso per approfondire questi aspetti.

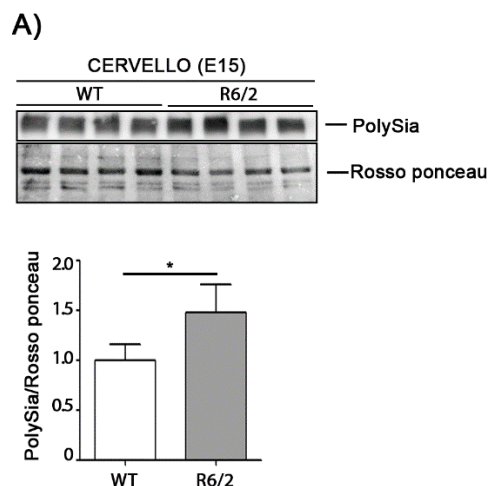
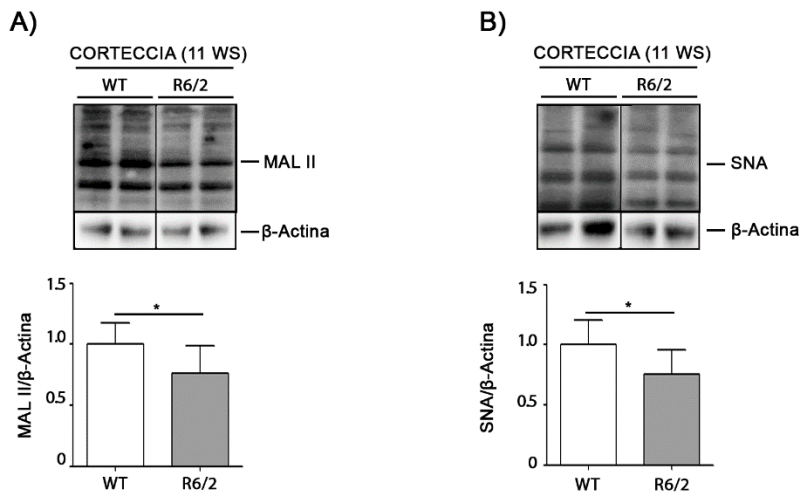


Figura 18. I livelli di polySia sono aumentati nel cervello di embrioni R6/2. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di polySia nel cervello (A) di embrioni R6/2 e WT. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=4 per ogni gruppo di topi. *, $p<0.05$. (*Unpaired t-test*).

7.8 I Livelli delle Lectine SNA e MAL II sono Alterati nella Corteccia di Topi MH

Al fine di valutare se l'alterazione dei sialo-glico-coniugati potesse coinvolgere non solo polySia, ma l'intero *pattern* di sializzazione di tutte le proteine ho utilizzato due lectine, *Sambucus Nigra Lectin* (SNA) e *Maackia Amurensis Lectin II* (MAL II). Le lectine sono una famiglia di proteine che sono altamente specifiche per determinati zuccheri e svolgono un importante ruolo biologico nel processo di riconoscimento dei polisaccaridi presenti sulle membrane cellulari. In particolar modo, la lectina SNA lega in maniera preferenziale l'acido sialico legato al galattosio in posizione α 2-6, mentre la lectina MAL II lega l'acido sialico in posizione α 2-3. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione dell'immunoreattività alle lectine SNA e MAL II nella corteccia di topi R6/2 in fase avanzata di malattia (figura 19 A-B), mentre non vi sono variazioni della stessa nell'ippocampo dei medesimi topi (figura 19 C-D). Ulteriori studi sono in corso per ampliare le analisi dell'immunoreattività di SNA e MAL II sia nello striato in fase avanzata di malattia che nelle altre fasi di malattia.



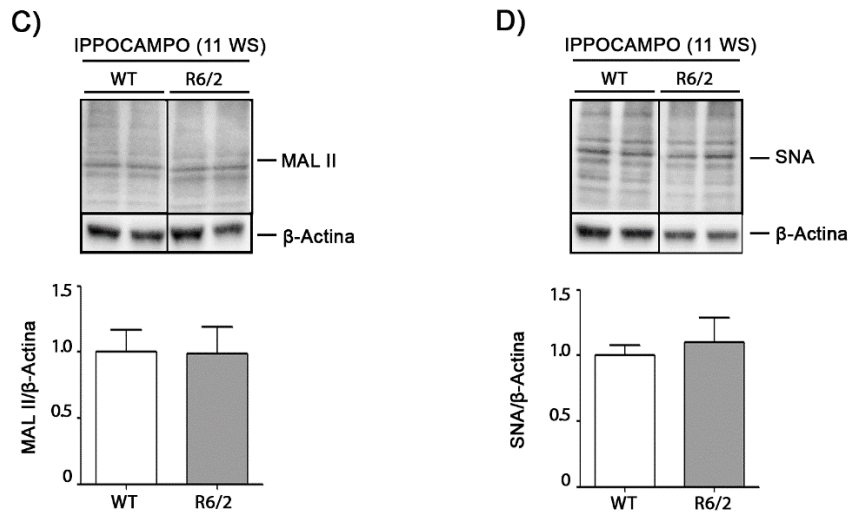


Figura 19. I livelli di MAL II e SNA sono diminuiti nella corteccia di topi R6/2. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di MAL II in corteccia (A) e in ippocampo (C) di topi R6/2 e WT. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di SNA in corteccia (B) e in ippocampo (D) di topi R6/2 e WT. In ogni *immunoblotting*, tutti i campioni sono stati corsi sullo stesso gel; campioni non adiacenti sono separati da una linea nera. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=7/9 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$. (*Unpaired t-test*).

7.9 La Modulazione dei Sialo-Glico-Coniugati è Possibile in Vivo

Studi precedenti, effettuati dal nostro gruppo, hanno dimostrato che la somministrazione intraventricolare di GM1 esogeno rappresenta un efficace bersaglio terapeutico per la MH (Di Pardo et al., 2012). Considerando che, i nostri risultati indicano che l'alterazione del metabolismo dei sialo-glico-coniugati, non è confinata esclusivamente ai glico-lipidi, ma anche alle glico-proteine ed allo scopo di valutare se tale metabolismo potesse essere modulato farmacologicamente, abbiamo sviluppato un nuovo approccio terapeutico. In particolar modo, attraverso la somministrazione intranasale in animali sani, di un analogo dell'acido sialico, definito POCME, con un *rate* d'incorporazione nella catena dei glicani estremamente elevato (Bull et al., 2015), e di un inibitore dell'acido sialico, definito F-NANA, fornitoci dal dottor Thomas J. Boltje dell'Università di Radboud, abbiamo dimostrato la possibilità di modulare il metabolismo dell'acido sialico (figura 20). Ulteriori studi, sono in corso, nel modello MH R6/2 per valutare l'eventuale effetto benefico del trattamento.

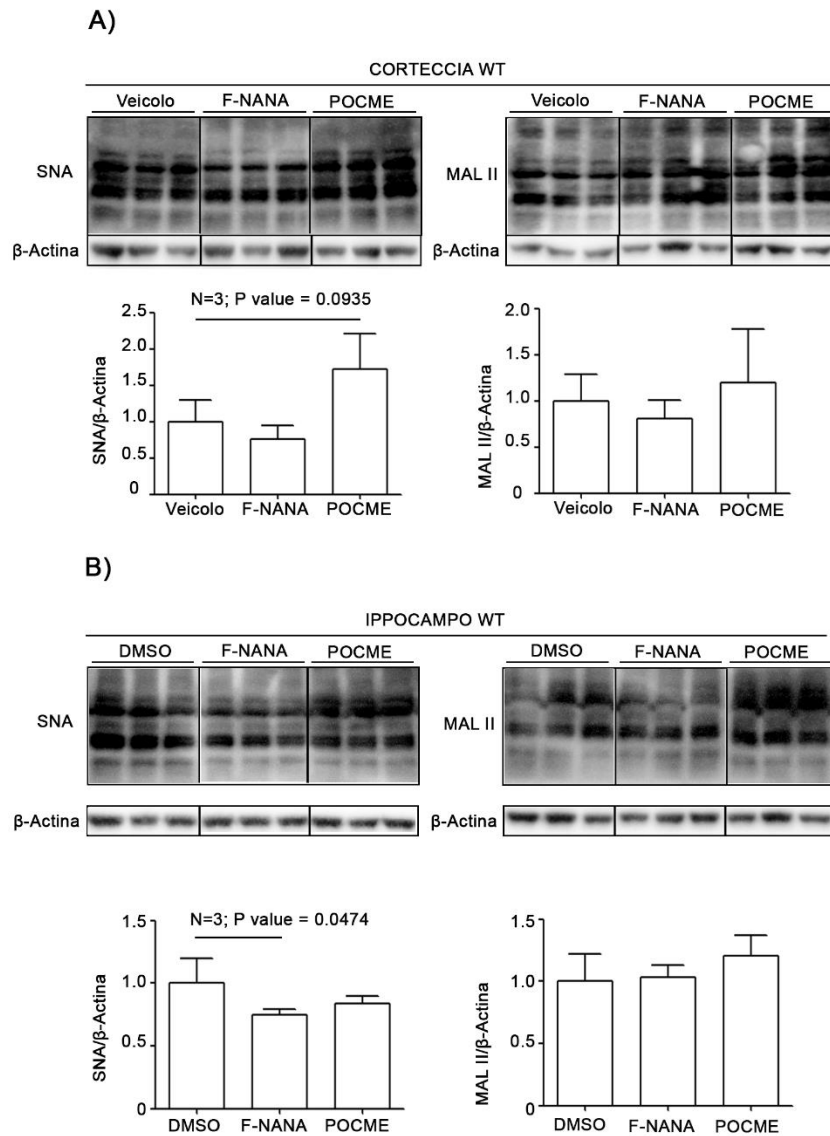


Figura 20. La modulazione del metabolismo dei sialo-glico-coniugati è possibile in vivo. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di SNA e MAL II in corteccia (A) e in ippocampo (C) di topi WT trattati con DMSO, F-NANA e POCME. In ogni *immunoblotting*, tutti i campioni sono stati corsi sullo stesso gel; campioni non adiacenti sono separati da una linea nera. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=3 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$. (*Unpaired t-test*).

7.10 I Livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di St3gal5 e B3galt4 sono Ridotti nel Cervelletto del Modello RTT Mecp2^{Bird} in Fase Avanzata di Malattia

Un alterato metabolismo dei gangliosidi è stato precedentemente associato, anche se non in maniera esaustiva e definitiva, alla RTT (Lekman et al., 1999; Seyfried et al., 2009), inoltre, la proteina MeCP2 è stata vista essere implicata nella regolazione del metabolismo lipidico

(Kyle et al., 2018). Al fine di valutare se la RTT potesse essere associata ad un alterato metabolismo dei gangliosidi ho analizzato i livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'espressione genica di St3gal5 (GM3 sintasi), B3galt4 (GM1 sintasi), St3gal2 (GD1a sintasi) e Neu1 (neuroaminidasi) nel cervelletto del modello murino *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa di tutti e tre i gangliosidi (figura 21 A-B-C) ed una diminuzione significativa dell'espressione genica di St3gal5 e B3galt4 (figura 21 D-E). I dati così ottenuti indicano che il modello murino *Mecp2^{Bird}* presenta un alterato metabolismo dei gangliosidi nel cervelletto, regione estremamente colpita dalla malattia e avente un ruolo chiave nell'apprendimento e nel controllo motorio, nella coordinazione, nel senso di equilibrio e in alcune funzioni cognitive legate al linguaggio e all'attenzione.

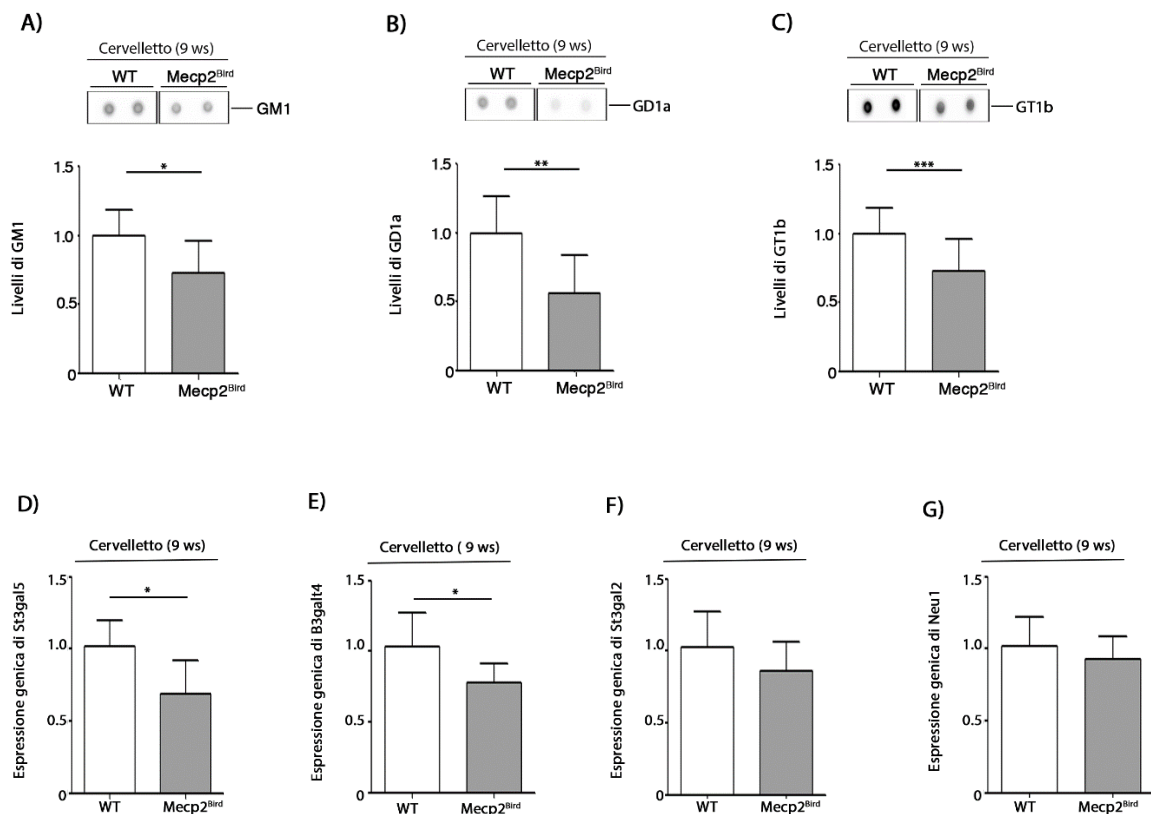


Figura 21. I Livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di St3gal5 e B3galt4 sono Ridotti nel Cervelletto di Topi RTT. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di GM1 (A), GD1a (B) e GT1b (C) nel cervelletto di topi *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia e WT. Analisi dell'espressione genica di St3gal5 (D), B3galt4 (E), St3gal2 (F) e Neu1 (G) nel cervelletto di topi *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia e WT. I dati sono rappresentati come media ± SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.0001. (Unpaired t-test).

7.11 I Livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di Neu1 sono Alterati nell'Ippocampo del Modello RTT Mecp2^{Bird} in Fase Avanzata di Malattia

Altra regione colpita nella RTT è l'ippocampo, deputata al controllo dell'apprendimento, della memoria a lungo termine e di quella dichiarativa, processi questi alterati nella patologia. Al fine di valutare se anche l'ippocampo potesse essere colpito da una alterazione dei gangliosidi ho analizzato i livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'espressione genica di St3gal5, B3galt4, St3gal2 e Neu1 nell'ippocampo del modello murino Mecp2^{Bird} in fase avanzata di malattia. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa di tutti e tre i gangliosidi (figura 22 A-B-C) ed un aumento significativo dell'espressione genica di Neu1 (figura 22 G). I dati così ottenuti indicano che il modello murino Mecp2^{Bird} presenta un alterato metabolismo dei gangliosidi anche nell'ippocampo.

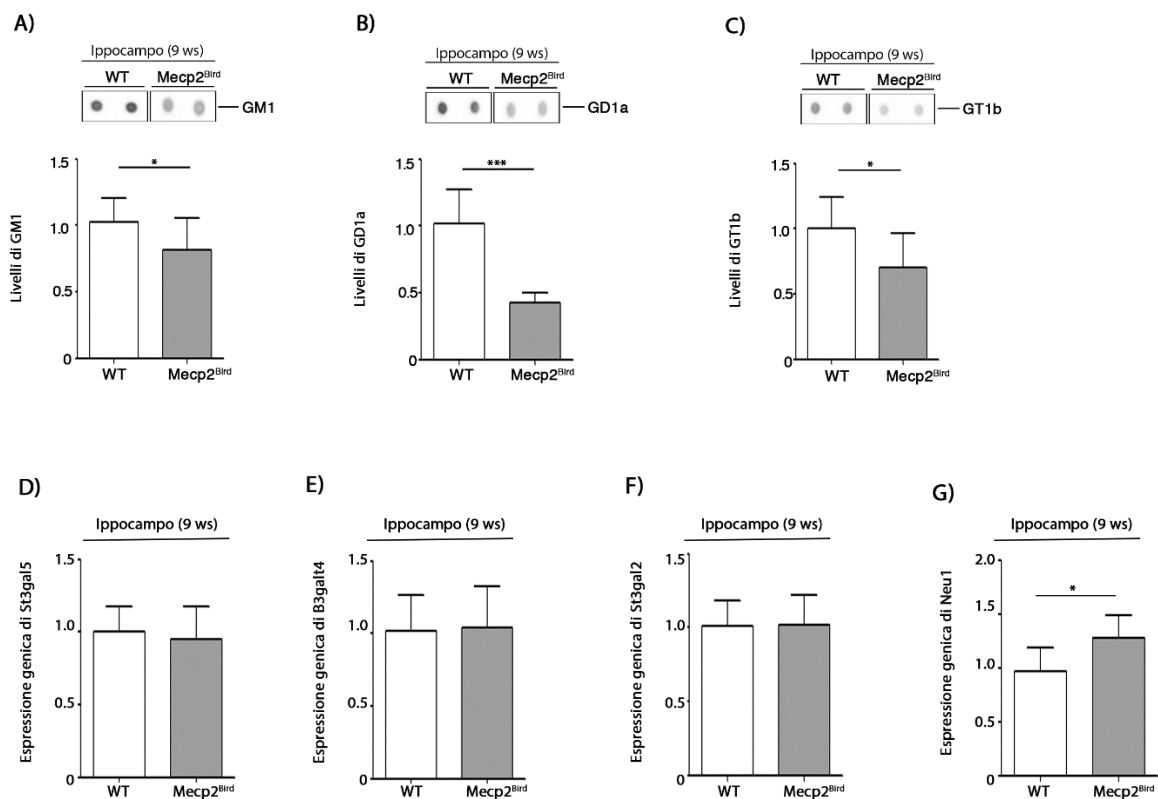


Figura 22. I Livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di Neu1 sono Alterati nell' Ippocampo di Topi RTT. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di GM1 (A), GD1a (B) e GT1b (C) nell'ippocampo di topi Mecp2^{Bird} in fase avanzata di malattia e WT. Analisi dell'espressione genica di St3gal5 (D), B3galt4 (E), St3gal2 (F) e Neu1 (G) nell'ippocampo di topi Mecp2^{Bird} in fase avanzata di malattia e WT.

I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.0001$. (Unpaired *t*-test).

7.12 I Livelli di GM1 e GD1a e l'Espressione Genica di B3galt4 sono Alterati nella Corteccia del Modello RTT Mecp2^{Bird} in Fase Avanzata di Malattia

Anche la corteccia, la regione cerebrale evolutivamente piú giovane e deputata al controllo di numerosissime funzioni quali: movimento, apprendimento, memoria a breve termine, linguaggio ed emozioni è affetta nella RTT. Al fine di valutare se anche la corteccia fosse caratterizzata da una alterazione dei gangliosidi ho analizzato i livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'espressione genica di St3gal5, B3galt4, St3gal2 e Neu1 nella corteccia del modello murino Mecp2^{Bird} in fase avanzata di malattia. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa di GM1 e GD1a (figura 23 A-B) ed un aumento significativo dell'espressione genica di B3galt4 (figura 23 E). I dati così ottenuti indicano che il modello murino Mecp2^{Bird} presenta un alterato metabolismo dei gangliosidi nella corteccia, simile a quello descritto nella MH.

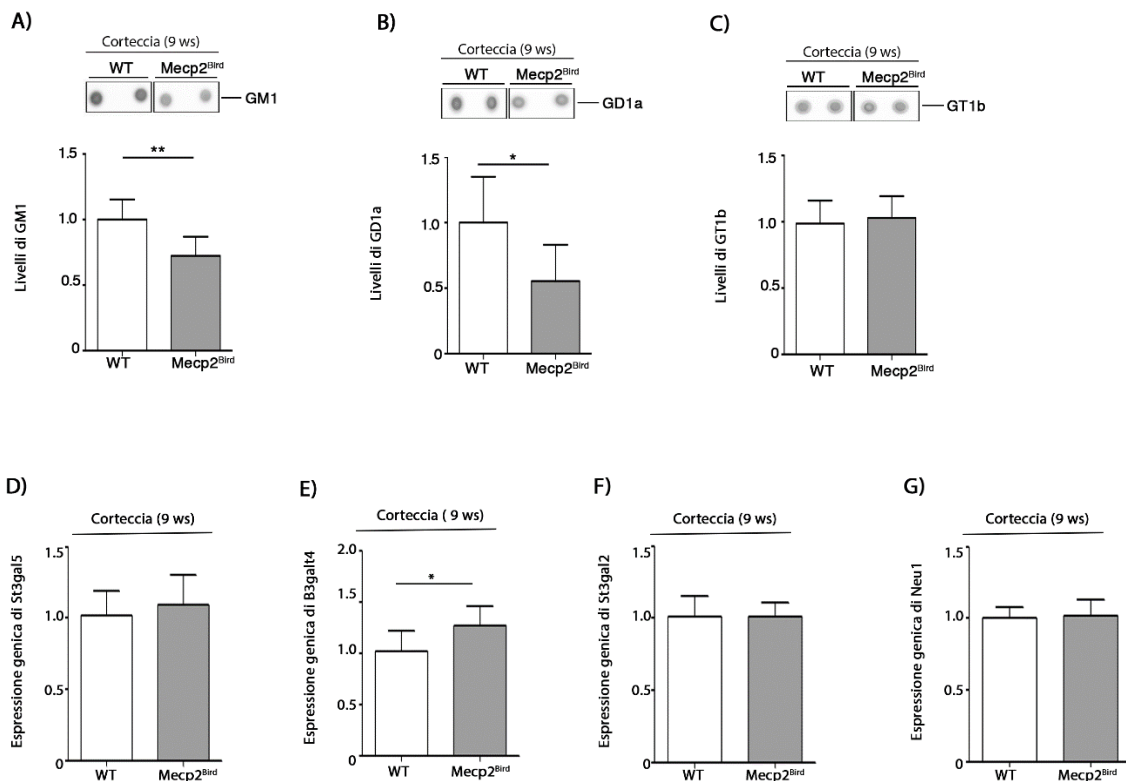


Figura 23. I Livelli di GM1 e GD1a e l'Espressione Genica di B3galt4 sono Alterati nella Corteccia di Topi RTT. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di GM1 (A), GD1a (B) e GT1b (C) nella corteccia di topi *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia e WT. Analisi dell'espressione genica di *St3gal5* (D), *B3galt4* (E), *St3gal2* (F) e *Neu1* (G) nella corteccia di topi *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia e WT. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$. (*Unpaired t-test*).

7.13 I Livelli di GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di Neu1 sono Alterati nello Striato del Modello RTT *Mecp2^{Bird}* in Fase Avanzata di Malattia

Nella MH lo striato, regione deputata alla pianificazione e alla modulazione dei movimenti, è caratterizzato da una alterazione dei livelli dei gangliosidi e da una alterata espressione genica degli enzimi coinvolti nella loro sintesi. Al fine di valutare se anche la RTT fosse caratterizzata da un'alterazione dei gangliosidi a livello striatale ho analizzato i livelli di GM1, GD1a e GT1b e l'espressione genica di *St3gal5*, *B3galt4*, *St3gal2* e *Neu1* nello striato del modello murino *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa di GD1a e GT1b (figura 24 B-C) ed un aumento significativo dell'espressione genica di *Neu1* (figura 24 G). I dati così ottenuti indicano che il modello murino *Mecp2^{Bird}* presenta un alterato metabolismo dei gangliosidi nello striato, simile a quello descritto per la MH.

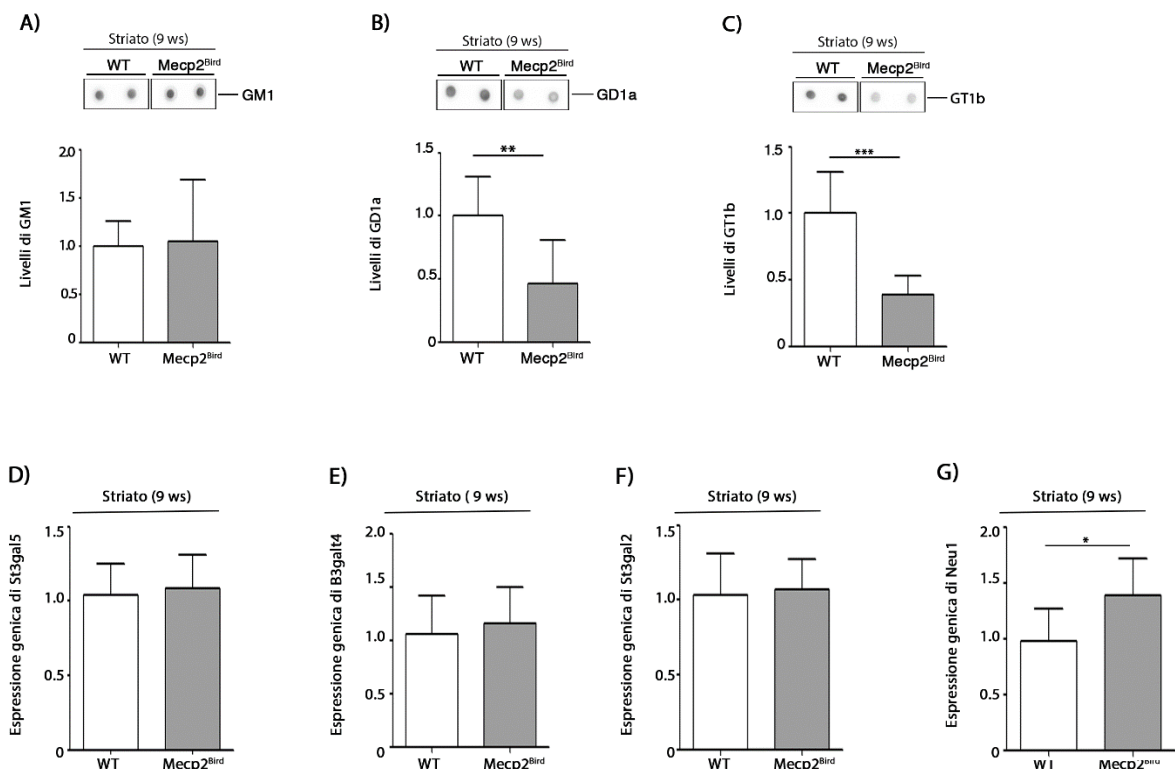


Figura 24. I Livelli di GD1a e GT1b e l'Espressione Genica di Neu1 sono Alterati nella Corteccia di Topi RTT. Immagine rappresentativa e analisi densitometrica dei livelli di GM1 (A), GD1a (B) e GT1b (C) nella corteccia di topi *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia e WT. Analisi dell'espressione genica di *St3gal5* (D), *B3gal4* (E), *St3gal2* (F) e *Neu1* (G) nella corteccia di topi *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia e WT. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$. (*Unpaired t-test*).

7.14 L'Espressione Genica di ST8Sia2 e ST8Sia4 è Ridotta nel Cervello del Modello RTT *Mecp2^{Bird}* in Fase Avanzata di Malattia

Al fine di valutare se l'alterazione del metabolismo dei sialo-glico-coniugati nella RTT non fosse esclusivamente correlata ai glicolipidi ma anche alle glicoproteine, ho analizzato i livelli degli enzimi coinvolti esclusivamente nella sintesi di polySia, ST8Sia2 e ST8Sia4, in striato e corteccia del modello murino *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione significativa di entrambi gli enzimi in tutte le aree del cervello analizzate (figura 25). Ulteriori studi sono in corso per approfondire questi aspetti.

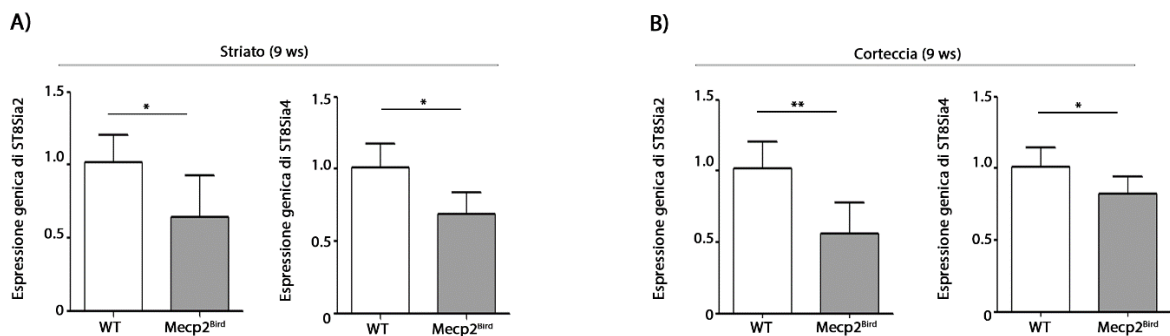


Figura 25. L'espressione genica degli enzimi ST8Sia2 e ST8Sia4 è ridotta nel cervello di topi *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia. Analisi dell'espressione genica di ST8Sia2 e ST8Sia4 in striato (A) e in corteccia (B) in topi *Mecp2^{Bird}* in fase avanzata di malattia e WT. I dati sono rappresentati come media \pm SD. N=6/8 per ogni gruppo di topi. *, $p < 0.05$. (*Unpaired t-test*).

8. DISCUSSIONE

Le alterazioni a carico del metabolismo dei sialo-glico-coniugati, glicolipidi e glicoproteine, influenzano profondamente la normale omeostasi del SNC. Infatti, tali molecole sono fondamentali nell'interazione cellula-cellula, nella trasduzione del segnale, nella sinaptogenesi e nello sviluppo del cervello (Schnaar et al., 2014). L'importanza ad esempio, dei gangliosidi nel SNC è sottolineata dal fatto che la perdita di GM2, GM1, GD1a e GT1a in topi nulli per GM2/GD2 sintasi, è accompagnata da neurodegenerazione e deficit motorio (Chiavegatto et al., 2000). Mutazioni a carico del gene *ST3GAL5* codificante la GM3 sintasi, enzima chiave nella biosintesi dei gangliosidi, promuovono l'insorgenza di un severo disordine infantile caratterizzato da disturbi motori ed epilessia (Simpson et al., 2004), fenotipi questi riconducibili alla RTT. Inoltre SNPs nel gene *ST8Sia2*, sialiltransferasi coinvolta esclusivamente nella sintesi di glicoproteine, sono associati a schizofrenia e disordini bipolari (Arai et al., 2006). Queste osservazioni ed altre indicano che il metabolismo dei sialo-glico-coniugati rappresenta una caratteristica patologica associata a diverse malattie neurologiche, sia neurodegenerative che del neurosviluppo. A tal proposito, il nostro gruppo, negli ultimi dieci anni, ha contribuito a dimostrare che la MH è caratterizzata da una alterazione del metabolismo dei gangliosidi già in fase pre-sintomatica di malattia (Maglione et al., 2010; Di Pardo et al., 2016).

In questo studio, al fine di valutare se la MH fosse caratterizzata da una generale alterazione dei sialo-coniugati, ho analizzato i livelli di polySia, un polimero lineare che lega esclusivamente le proteine, dimostrando per la prima volta una alterazione dei livelli di polySia in diverse regioni del cervello ed in differenti fasi di malattia in un modello preclinico di MH. I dati mostrano una riduzione significativa di polySia in fase avanzata di malattia, indice, a nostro avviso, di un sistema ormai completamente alterato e non funzionante. Da sottolineare, invece, l'alterazione di polySia, oltre che in fase iniziale di malattia, anche in fase presintomatica di malattia, indice di un ruolo chiave del metabolismo dei sialo-glico-coniugati nell'eziopatogenesi della MH. Sebbene non conosciamo la causa di questa alterazione, noi ipotizziamo, considerando anche il ruolo chiave dell'HTT nella regolazione trascrizionale, che possa dipendere direttamente dalla mutazione e non rappresentare un semplice epifenomeno. Inoltre, sebbene il ruolo fisiopatologico di tale alterazione rimane ancora da chiarire, noi ipotizziamo che l'aumento dei livelli di polySia, già in fase presintomatica, potrebbe determinare un alterato processo di mielinizzazione e una alterata plasticità sinaptica, processi questi regolati finemente dallo stesso polySia ed

alterati nella MH. Diversi studi indicano, infatti che polySia aiuta gli OPC a rimanere in uno stato indifferenziato, impedendo la maturazione degli oligodendrociti e la corretta formazione della mielina (Glaser et al., 2007). Ulteriori studi sono in corso per verificare sperimentalmente la nostra ipotesi. L'alterazione dei livelli di polySia può teoricamente dipendere da una alterata espressione o da una alterata attività degli enzimi coinvolti esclusivamente nella sua sintesi, ST8Sia2 e ST8Sia4. In accordo con ciò, le analisi di espressione genica mostrano una riduzione di ST8Sia2 in tutte le regioni analizzate in fase avanzata di malattia ed una riduzione di ST8Sia4 solo nello striato degli stessi animali, sottolineando la maggiore vulnerabilità e sofferenza dello striato nella MH. In fase iniziale di malattia, nonostante l'aumento dei livelli di polySia, i livelli di espressione genica di ST8Sia2 sono diminuiti, mentre sono invariati i livelli di ST8Sia4. Inoltre, in fase pre-sintomatica di malattia osserviamo una aumentata espressione genica di ST8Sia4 nello striato e nessuna variazione di ST8Sia2. Noi ipotizziamo che l'espressione di ST8Sia4, preponderante in età adulta, in fase pre-sintomatica di malattia rappresenti un meccanismo di risposta o di compensazione ad uno stimolo, come ad esempio la mutazione, e quindi conseguenza diretta di una alterata regolazione trascrizionale. Con l'avanzare della malattia, e quindi con la comparsa dei sintomi, l'espressione di ST8Sia2 viene *down*-regolata in quanto il sistema non riesce più a compensare e/o rispondere allo stimolo. Ulteriori studi saranno necessari per verificare la nostra ipotesi.

Sempre più condivisa è l'idea che la MH sia caratterizzata anche da una fase neuro-disfunzionale che precede la fase di neurodegenerazione (Humbert, 2010). Infatti, diverse evidenze scientifiche dimostrano il ruolo chiave svolto dall'HTT durante lo sviluppo embrionale (Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995), inoltre, varianti geniche dell'HTT sono state associate a disordini del neurosviluppo con fenotipo riconducibile alla RTT, definita classicamente come disordine del neurosviluppo (Rodan et al., 2016; Lopes et al., 2016). Anche i sialo-glico-coniugati, in particolare polySia, svolgono un ruolo chiave durante lo sviluppo embrionale del cervello, essendo essenziale per una corretta migrazione cellulare (Schnaar et al., 2014). Alla luce di queste evidenze, l'analisi di embrioni MH al quindicesimo giorno di gestazione ha mostrato un aumento dei livelli di polySia, indicando un precoce sbilanciamento dei sialo-glico-coniugati nella MH, supportando l'ipotesi che queste alterazioni possano da un lato dipendere direttamente dalla mutazione, mentre, dall'altro contribuire alla patogenesi della malattia e non rappresentare soltanto un epifenomeno associato alla progressione della patologia stessa.

La conferma di questi risultati rappresenterebbe un traguardo importante per la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'eziopatogenesi della malattia.

Sebbene siano stati condotti numerosi studi per lo sviluppo di nuovi trattamenti per la MH, l'identificazione di nuovi ed efficaci bersagli terapeutici desta oggi grande interesse. Il nostro gruppo ha precedentemente dimostrato che il metabolismo dei sialo-glico-coniugati può rappresentare un efficace bersaglio terapeutico (Di Pardo et al., 2012; Alpaugh et al., 2017). In questo studio, attraverso l'utilizzo di un analogo dell'acido sialico, POCME ed un inibitore dell'acido sialico, F-NANA, abbiamo dimostrato la possibilità di modulare in vivo in animali sani la sializzazione delle proteine, senza dover ricorrere a tecniche chirurgiche invasive per l'animale. Tale approccio potrebbe rappresentare un prezioso obiettivo farmacologico, affinché, indagando su aspetti non ancora del tutto esplorati, sia possibile sviluppare approcci più mirati ed efficaci per il trattamento della MH.

Per comprendere ed approfondire i meccanismi comuni o non comuni a processi neuro-disfunzionali e neurodegenerativi ho intrapreso l'analisi del metabolismo dei sialo-glico-coniugati in un modello murino di RTT.

Diverse evidenze scientifiche indicano che la RTT sia caratterizzata da un'alterata omeostasi lipidica, in particolar modo alcuni lavori mostrano, anche se non in maniera esaustiva e definitiva, come pazienti RTT presentino un metabolismo dei gangliosidi aberrante (Kyle et., 2018).

Il nostro studio dimostra per la prima volta come un modello murino RTT sia caratterizzato da una diminuzione dei gangliosidi GM1, GD1a e GT1b in fase avanzata di malattia e da una alterata espressione genica degli enzimi coinvolti nella sintesi e nella degradazione degli stessi, simile a quella descritta nella MH. Noi ipotizziamo che la riduzione costante di GD1a, in tutte le aree analizzate, possa contribuire alla disfunzione assonale e alla ipoconnettività del cervello tipica della RTT.

Inoltre, l'alterazione dell'espressione genica di ST8Sia2 e ST8Sia4, indica che la RTT sia caratterizzata anche da una alterazione delle glico-proteine, simile a quella descritta nella MH. Ulteriori studi saranno necessari per valutare il potenziale patogenetico di tale alterazione nella malattia.

I risultati ottenuti in questo studio individuano nel metabolismo dei sialo-glico-coniugati un possibile *link* tra due patologie rare, la MH e la RTT, così apparentemente lontane e diverse.

In conclusione, questo studio sottolinea ancor di più l'importanza che i sialo-glico-coniugati hanno nel SNC, in particolar modo del ruolo che essi svolgono nell'eziopatogenesi di malattie neurologiche, siano esse del neurosviluppo o neurodegenerative.

9. APPENDICE

Durante il mio percorso di dottorato ho partecipato a differenti lavori:

- ✓ Hum Mol Genet. 2018 Jul 15;27(14):2490-2501. doi: 10.1093/hmg/ddy153.

Stimulation of S1PR5 with A-971432, a selective agonist, preserves blood-brain barrier integrity and exerts therapeutic effect in an animal model of Huntington's disease.

Di Pardo A¹, Castaldo S¹, Amico E¹, **Pepe G¹**, Marracino F¹, Capocci L¹, Giovannelli A¹, Madonna M¹, van Bergeijk J², Buttari F¹, van der Kam E², Maglione V¹.

Author information

1 IRCCS Neuromed, Località Camerelle, Pozzilli (IS), Italy.

2 AbbVie Deutschland GmbH & Co KG, Knollstrasse 50, Ludwigshafen, Germany.

Abstract

Huntington's disease (HD) is the most common neurodegenerative disorder for which no effective cure is yet available. Although several agents have been identified to provide benefits so far, the number of therapeutic options remains limited with only symptomatic treatment available. Over the past few years, we have demonstrated that sphingolipid-based approaches may open the door to new and more targeted treatments for the disease. In this study, we investigated the therapeutic potential of stimulating sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor 5 by the new selective agonist A-971432 (provided by AbbVie) in R6/2 mice, a widely used HD animal model. Chronic administration of low-dose (0.1 mg/kg) A-971432 slowed down the progression of the disease and significantly prolonged lifespan in symptomatic R6/2 mice. Such beneficial effects were associated with activation of pro-survival pathways (BDNF, AKT and ERK) and with reduction of mutant huntingtin aggregation. A-971432 also protected blood-brain barrier (BBB) homeostasis in the same mice. Interestingly, when administered early in the disease, before any overt symptoms, A-971432 completely protected HD mice from the classic progressive motor deficit and preserved BBB integrity. Beside representing a promising strategy to take into consideration for the development of alternative therapeutic options for HD, selective stimulation of S1P receptor 5 may be also seen as an effective approach to target brain vasculature defects in the disease.

✓ Front Neurosci. 2017 Dec 19;11:698. doi: 10.3389/fnins.2017.00698. eCollection 2017.

***De novo* Synthesis of Sphingolipids Is Defective in Experimental Models of Huntington's Disease.**

Di Pardo A¹, Basit A², Armirotti A², Amico E¹, Castaldo S¹, **Pepe G¹**, Marracino F¹, Buttari F¹, Digilio AF³, Maglione V¹.

Author information

1 IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italy.

2 Department of Drug Discovery and Development, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, Italy.

3 Institute of Biosciences and Bioresources, National Research Council, Naples, Italy.

Abstract

Alterations of lipid metabolism have been frequently associated with Huntington's disease (HD) over the past years. HD is the most common neurodegenerative disorder, with a complex pathogenic profile, typically characterized by progressive striatal and cortical degeneration and associated motor, cognitive and behavioral disturbances. Previous findings from our group support the idea that disturbed sphingolipid metabolism could represent an additional hallmark of the disease. Although such a defect represents a common biological denominator among multiple disease models ranging from cells to humans through mouse models, more efforts are needed to clearly define its clinical significance and the role it may play in the progression of the disease. In this study, we provided the first evidence of a defective *de novo* biosynthetic pathway of sphingolipids in multiple HD pre-clinical models. qPCR analysis revealed perturbed gene expression of sphingolipid-metabolizing enzymes in both early and late stage of the disease. In particular, reduction in the levels of *sptlc1* and *cerS1* mRNA in the brain tissues from manifest HD mice resulted in a significant decrease in the content of dihydroSphingosine, dihydroSphingosine-1-phosphate and dihydroCeramide [C18:0] as assessed by mass spectrometry. Moreover, *in vitro* studies highlighted the relevant role that aberrant sphingolipid metabolism may have in the HD cellular homeostasis. With this study, we consolidate the evidence of disturbed sphingolipid metabolism in HD and demonstrate for the first time that the *de novo* biosynthesis pathway is also significantly affected in the disease. This finding further supports the hypothesis that

perturbed sphingolipid metabolism may represent a crucial factor accounting for the high susceptibility to disease in HD.

✓ Sci Rep. 2017 Jul 13;7(1):5280. doi: 10.1038/s41598-017-05709-y.

Defective Sphingosine-1-phosphate metabolism is a druggable target in Huntington's disease.

Di Pardo A¹, Amico E¹, Basit A², Armirotti A², Joshi P³, Neely MD³, Vuono R⁴, Castaldo S¹, Digilio AF⁵, Scalabrì F¹, **Pepe G**¹, Elifani F¹, Madonna M¹, Jeong SK⁶, Park BM⁷, D'Esposito M^{1,8}, Bowman AB³, Barker RA⁴, Maglione V⁹.

Author information

1 IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italy.

2 Department of Drug Discovery and Development, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, Italy.

3 Departments of Pediatrics, Neurology and Biochemistry, Vanderbilt University (VU) and VU Medical Center Pediatric Neurology Research Lab, Nashville, TN, USA.

4 John van Geest Cambridge Centre for Brain Repair, Department of Clinical Neuroscience, University of Cambridge, Cambridge, UK.

5 Institute of Biosciences and Bioresources (IBBR), National Research Council (CNR), Naples, Italy.

6 Department of of Cosmetic Science, Seowon University, Cheongju, Korea.

7 NeoPharm USA Inc. Engelwood Cliffs, New Jersey, USA.

8 Institute of Genetics and Biophysics "A. Buzzati-Traverso", Naples, Italy.

9 IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italy. vittorio.maglione@neuromed.it.

Abstract

Huntington's disease is characterized by a complex and heterogeneous pathogenic profile. Studies have shown that disturbance in lipid homeostasis may represent a critical determinant in the progression of several neurodegenerative disorders. The recognition of perturbed lipid metabolism is only recently becoming evident in HD. In order to provide more insight into the nature of such a perturbation and into the effect its modulation may have in HD pathology, we investigated the metabolism of Sphingosine-1-phosphate (S1P),

one of the most important bioactive lipids, in both animal models and patient samples. Here, we demonstrated that S1P metabolism is significantly disrupted in HD even at early stage of the disease and importantly, we revealed that such a dysfunction represents a common denominator among multiple disease models ranging from cells to humans through mouse models. Interestingly, the in vitro anti-apoptotic and the pro-survival actions seen after modulation of S1P-metabolizing enzymes allows this axis to emerge as a new druggable target and unfolds its promising therapeutic potential for the development of more effective and targeted interventions against this incurable condition.

✓ [Sci Rep](https://doi.org/10.1038/srep41316) 2017 Jan 24;7:41316. doi: 10.1038/srep41316.

Impairment of blood-brain barrier is an early event in R6/2 mouse model of Huntington Disease.

[Di Pardo A¹](#), [Amico E¹](#), [Scalabrì F¹](#), **[Pepe G¹](#)**, [Castaldo S¹](#), [Elifani F¹](#), [Capocci L¹](#), [De Sanctis C¹](#), [Comerci L²](#), [Pompeo F¹](#), [D'Esposito M^{1,3}](#), [Filosa S^{1,2}](#), [Crispi S²](#), [Maglione V¹](#).

Author information

1 IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italy.

2 Institute of Biosciences and Bioresources, IBBR, CNR, Napoli, Italy.

3 Institute of Genetics and Biophysics "A. Buzzati-Traverso", Naples, Italy.

Abstract

Blood-brain barrier (BBB) breakdown, due to the concomitant disruption of the tight junctions (TJs), normally required for the maintenance of BBB function, and to the altered transport of molecules between blood and brain and vice-versa, has been suggested to significantly contribute to the development and progression of different brain disorders including Huntington's disease (HD). Although the detrimental consequence the BBB breakdown may have in the clinical settings, the timing of its alteration remains elusive for many neurodegenerative diseases. In this study we demonstrate for the first time that BBB disruption in HD is not confined to established symptoms, but occurs early in the disease progression. Despite the obvious signs of impaired BBB permeability were only detectable in concomitance with the onset of the disease, signs of deranged TJs integrity occur precociously in the disease and precede the onset of overt symptoms. To our perspective this finding may add a new dimension to the horizons of pathological mechanisms underlying

this devastating disease, however much remains to be elucidated for understanding how specific BBB drug targets can be approached in the future.

- ✓ Brief Funct Genomics. 2016 Nov;15(6):420-431. Epub 2016 Jun 12.

MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture.

Della Ragione F, Vacca M, Fioriniello S, **Pepe G**, D'Esposito M.

Abstract

It has been a long trip from 1992, the year of the discovery of MECP2, to the present day. What is surprising is that some of the pivotal roles of MeCP2 were already postulated at that time, such as repression of inappropriate expression from repetitive elements and the regulation of pericentric heterochromatin condensation. However, MeCP2 performs many more functions. MeCP2 is a reader of epigenetic information contained in methylated (and hydroxymethylated) DNA, moving from the 'classical' CpG doublet to the more complex view addressed by the non-CpG methylation, which is a feature of the postnatal brain. MECP2 is a transcriptional repressor, although when it forms complexes with the appropriate molecules, it can become a transcriptional activator. For all of these aspects, Rett syndrome, which is caused by MECP2 mutations, is considered a paradigmatic example of a 'chromatin disorder'. Even if the hunt for bona-fide MECP2 target genes is far from concluded today, the role of MeCP2 in the maintenance of chromatin architecture appears to be clearly established. Taking a cue from the non-scientific literature, we can firmly attest that MeCP2 is a player with 'a great future behind it'*. *V. Gassmann 'Un grande avvenire dietro le spalle'.

10. BIBLIOGRAFIA

Alba Di Pardo, Enrico Amico, Vittorio Maglione. Impaired Levels of Gangliosides in the Corpus Callosum of Huntington Disease Animal Models. *Front Neurosci.* 2016; 10: 457. Published online 2016 Oct 6. doi: 10.3389/fnins.2016.00457.

Alba Di Pardo, Vittorio Maglione, Melanie Alpaugh, Melanie Horkey, Randy S. Atwal, Jenny Sassone, Andrea Ciammola, Joan S. Steffan, Karim Fouad, Ray Truant, and Simonetta Sipione. Ganglioside GM1 induces phosphorylation of mutant huntingtin and restores normal motor behavior in Huntington disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 28;109(9):3528-33. doi: 10.1073/pnas.1114502109. Epub 2012 Feb 13.

Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M. & Wiegand, S.J. (1997) Anterograde transport of brain- derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, 389, 856±860.

Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG- binding protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185–188, 1999.

Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA, et al. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet.* 1993 Aug;4(4):398-403.

Angata K, Long JM, Bukalo O, Lee W, Dityatev A, Wynshaw-Boris A, Schachner M, Fukuda M, Marth JD. Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32603-13. Epub 2004 May 12.

Anney R, Klei L, Pinto D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Sykes N, Pagnamenta AT, Almeida J, Bacchelli E, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chu SH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar

P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizzi R, Kim C, Klauck SM, Kolevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougle CJ, McGrath J, McMahon WM, Melhem NM, Merikangas A, Migita O, Minschew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, Piven J, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapuram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Wing K, Wittmeyer K, Wood S, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Betancur C, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI Jr, Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Scherer SW, Sutcliffe JS, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Devlin B, Ennis S, Hallmayer J. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet.* 2010 Oct 15;19(20):4072-82. doi: 10.1093/hmg/ddq307. Epub 2010 Jul 27.

Arai M, Yamada K, Toyota T, Obata N, Haga S, Yoshida Y, Nakamura K, Minabe Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2006 Apr 1;59(7):652-9. Epub 2005 Oct 17.

Archer HL, Whatley SD, Evans JC, Ravine D, Huppke P, Kerr A, Bunyan D, Kerr B, Sweeney E, Davies SJ, Reardon W, Horn J, MacDermot KD, Smith RA, Magee A, Donaldson A, Crow Y, Hermon G, Miedzybrodzka Z, Cooper DN, Lazarou L, Butler R, Sampson J, Pilz DT, Laccione F, Clarke AJ. Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *J Med Genet* 43:451-456, 2006.

Ariani F¹, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008 Jul;83(1):89-93. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.05.015. Epub 2008 Jun 19.

Atwal RS, Xia J, Pinchev D, Taylor J, Eband RM, Truant R. Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum Mol Genet.* 2007 Nov 1;16(21):2600-15. Epub 2007 Aug 18.

Ben-Shachar S, Chahrour M, Thaller C, Shaw CA, Zoghbi HY. Mouse models of MeCP2 disorders share gene expression changes in the cerebellum and hypothalamus. *Hum Mol Genet* 18:2431-2442, 2009.

Bird AP. Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 11:94-100, 1995.

Bley AE, Giannikopoulos OA, Hayden D, Kubilus K, Tiffit CJ, Eichler FS. Natural history of infantile G(M2) gangliosidosis. *Pediatrics.* 2011 Nov;128(5): e1233-41. doi: 10.1542/peds.2011-0078. Epub 2011 Oct 24.

Büll C, Heise T, Beurskens DM, Riemersma M, Ashikov A, Rutjes FP, van Kuppevelt TH, Lefeber DJ, den Brok MH, Adema GJ, Boltje TJ. Sialic Acid Glycoengineering Using an Unnatural Sialic Acid for the Detection of Sialoglycan Biosynthesis Defects and On-Cell Synthesis of Siglec Ligands. *ACS Chem Biol.* 2015 Oct 16;10(10):2353-63. doi: 10.1021/acscchembio.5b00501. Epub 2015 Aug 10.

Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci.* 1999 Apr 15;19(8):3248-57.

Chadwick LH, Wade PA. MeCP2 in Rett syndrome: transcriptional repressor or chromatin architectural protein? *Curr Opin Genet Dev* 17:121-125, 2007.

Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*, 2008.

Chahrour, M., Zoghbi, H.Y. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56, 422–437, 2007.

Della Ragione F, Filosa S, Scalabri F, D'Esposito M. MeCP2 as a genome-wide modulator: the renewal of an old story. *Front Genet* 3:181, 2012.

Di Pardo A, Amico E, Favellato M, Castrataro R, Fucile S, Squitieri F, Maglione V. FTY720 (fingolimod) is a neuroprotective and disease-modifying agent in cellular and mouse models of Huntington disease. *Hum Mol Genet.* 2014 May 1;23(9):2251-65. doi: 10.1093/hmg/ddt615. Epub 2013 Dec 2.

Di Pardo A, Amico E, Basit A, Armirotti A, Joshi P, Neely MD, Vuono R, Castaldo S, Digilio AF, Scalabrì F, Pepe G, Elifani F, Madonna M, Jeong SK, Park BM, D'Esposito M, Bowman AB, Barker RA, Maglione V. Defective Sphingosine-1-phosphate metabolism is a druggable target in Huntington's disease. *Sci Rep.* 2017 Jul 13;7(1):5280. doi: 10.1038/s41598-017-05709-y. Erratum in: *Sci Rep.* 2018 May

Di Pardo A, Basit A, Armirotti A, Amico E, Castaldo S, Pepe G, Marracino F, Buttari F, Digilio AF, Maglione V. *De novo* Synthesis of Sphingolipids Is Defective in Experimental Models of Huntington's Disease. *Front Neurosci.* 2017 Dec 19;11:698. doi: 10.3389/fnins.2017.00698. eCollection 2017.

Di Pardo A, Castaldo S, Amico E, Pepe G, Marracino F, Capocci L, Giovannelli A, Madonna M, van Bergeijk J, Buttari F, van der Kam E, Maglione V. Stimulation of S1PR5 with A-971432, a selective agonist, preserves blood-brain barrier integrity and exerts therapeutic effect in an animal model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2018 Jul 15;27(14):2490-2501. doi: 10.1093/hmg/ddy153.

Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A. Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2000 Jul 15;20(14):5234-44.

Fehr S¹, Wilson M, Downs J, Williams S, Murgia A, Sartori S, Vecchi M, Ho G, Polli R, Psoni S, Bao X, de Klerk N, Leonard H, Christodoulou J. The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *Eur J Hum Genet*. 2013 Mar;21(3):266-73. doi: 10.1038/ejhg.2012.156. Epub 2012 Aug 8.

Florian A, Siebzehnriibl, Kerstin A. Raber, Yvonne K. Urbach, Anja Schulze-Krebs, Fabio Canneva, Sandra Mocerri, Johanna Habermeyer, Dalila Achoui, Bhavana Gupta, Dennis A. Steindler, Michael Stephan, Huu Phuc Nguyen, Michael Bonin, Olaf Riess, Andreas Bauer, Ludwig Aigner, Sebastien Couillard-Despres, Martin Arce Paucar, Per Svenningsson, Alexander Osmand, Alexander Andrew, Claus Zabel, Andreas Weiss, Rainer Kuhn, Saliha Moussaoui, Ines Blockx, Annemie Van der Linden, Rachel Y, Cheong, Laurent Roybon, Åsa Petersén, Stephan von Hörsten. Early postnatal behavioral, cellular, and molecular changes in models of Huntington disease are reversible by HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Sep 11; 115(37): E8765–E8774. Published online 2018 Aug 27. doi: 10.1073/pnas.1807962115.

Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff M, Hartmann M, Weinhold B, Hildebrandt H, Geyer R, Mühlenhoff M, Geyer H. Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 1;107(22):10250-5. doi: 10.1073/pnas.0912103107. Epub 2010 May 17.

Ghosh R¹, Tabrizi SJ². Huntington disease. *Handb Clin Neurol*. 2018;147:255-278. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00017-8.

Glanz VY, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Sialidase activity in human pathologies. *Eur J Pharmacol*. 2019 Jan 5;842:345-350. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.11.014. Epub 2018 Nov 12.

Glaser T, Brose C, Franceschini I, Hamann K, Smorodchenko A, Zipp F, Dubois-Dalcq M, Brüstle O. Neural cell adhesion molecule polysialylation enhances the sensitivity of embryonic stem cell-derived neural precursors to migration guidance cues. *Stem Cells*. 2007 Dec;25(12):3016-25.

Godin JD, Poizat G, Hickey MA, Maschat F, Humbert S. Mutant huntingtin-impaired degradation of beta-catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *EMBO J*. 2010 Jul 21;29 (14):2433-45. doi:10.1038/emboj.2010.117. Epub 2010 Jun 8.

Gu X, et al. (2009) Serines 13 and 16 are critical determinants of full-length human mutant huntingtin induced disease pathogenesis in HD mice. *Neuron* **64**:828–840.

Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*. 1983 Nov 17-23;306 (5940):234-8.

Guy J¹, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):322-6.

HD iPSC Consortium. Developmental alterations in Huntington's disease neural cells and pharmacological rescue in cells and mice. *Nat Neurosci*. 2017 May;20(5):648-660. doi: 10.1038/nn.4532. Epub 2017 Mar 20.

Hildebrandt H¹, Dityatev A. Polysialic Acid in Brain Development and Synaptic Plasticity. *Top Curr Chem*. 2015;366:55-96. doi: 10.1007/128_2013_446.

Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of *DLX5* in Rett syndrome. *Nat Genet* 37:31-40, 2005.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187-191, 1998.

Kegel KB, Meloni AR, Yi Y, Kim YJ, Doyle E, Cuiffo BG, Sapp E, Wang Y, Qin ZH, Chen JD, Nevins JR, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):7466-76. Epub 2001 Dec 5.

Koles K, Repnikova E, Pavlova G, Korochkin LI, Panin VM. Sialylation in protostomes: a perspective from *Drosophila* genetics and biochemistry. *Glycoconj J*. 2009 Apr;26(3):313-24. doi: 10.1007/s10719-008-9154-4. Epub 2008 Jun 21.

Kremer B¹, Almqvist E, Theilmann J, Spence N, Telenius H, Goldberg YP, Hayden MR. Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet*. 1995 Aug;57(2):343-50.

Kriaucionis S, Bird A. The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 32:1818-1823, 2004.

Kyle SM^{1,2}, Vashi N^{1,3}, Justice MJ^{4,2,3}. Rett syndrome: a neurological disorder with metabolic components. *Open Biol*. 2018 Feb;8(2). pii: 170216. doi: 10.1098/rsob.170216.

Lee JS¹, Yoo Y², Lim BC³, Kim KJ³, Song J⁴, Choi M², Chae JH³. GM3 synthase deficiency due to ST3GAL5 variants in two Korean female siblings: Masquerading as Rett syndrome-like phenotype. *Am J Med Genet A*. 2016 Aug;170(8):2200-5. doi: 10.1002/ajmg.a.37773. Epub 2016 May 27.

Lekman AY¹, Hagberg BA, Svennerholm LT. Cerebrospinal fluid gangliosides in patients with Rett syndrome and infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Eur J Paediatr Neurol*. 1999;3(3):119-23.

Leroy JG, Seppala R, Huizing M, Dacremont G, De Simpel H, Van Coster RN, Orvisky E, Krasnewich DM, Gahl WA. Dominant inheritance of sialuria, an inborn error of feedback inhibition. *Am J Hum Genet*. 2001 Jun;68(6):1419-27. Epub 2001 Apr 18.

Li F, Ding J. Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression. *Protein Cell*. 2018 Nov 26. doi: 10.1007/s13238-018-0597-5.

Lopes F, Barbosa M, Ameer A, Soares G, de Sá J, Dias AI, Oliveira G, Cabral P, Temudo T, Calado E, Cruz IF, Vieira JP, Oliveira R, Esteves S, Sauer S, Jonasson I, Syvänen AC, Gyllenstein U, Pinto D, Maciel P. Identification of novel genetic causes of Rett syndrome-like phenotypes. *J Med Genet*. 2016 Mar;53(3):190-9. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103568. Epub 2016 Jan 6.

MacDonald ME, Barnes G, Srinidhi J, Duyao MP, Ambrose CM, Myers RH, Gray J, Conneally PM, Young A, Penney J, et al. Gametic but not somatic instability of CAG repeat length in Huntington's disease. *J Med Genet*. 1993 Dec;30(12):982-6.

Maglione V, Marchi P, Di Pardo A, Lingrell S, Horkey M, Tidmarsh E, Sipione S. Impaired ganglioside metabolism in Huntington's disease and neuroprotective role of GM1. *J Neurosci*. 2010 Mar 17;30(11):4072-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6348-09.2010.

Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*. 1996 Nov 1;87(3):493-506.

Martin DD¹, Heit RJ², Yap MC², Davidson MW³, Hayden MR⁴, Berthiaume LG⁵. Identification of a post-translationally myristoylated autophagy-inducing domain released by caspase cleavage of huntingtin. *Hum Mol Genet*. 2014 Jun 15;23(12):3166-79. doi: 10.1093/hmg/ddu027. Epub 2014 Jan 23.

Melanie Alpaugh, Danny Galleguillos, Juan Forero, Luis Carlos Morales, Sebastian W Lackey, Preeti Kar, Alba Di Pardo, Andrew Holt, Bradley J Kerr, Kathryn G Todd, Glen B Baker, Karim Fouad, Simonetta Sipione. Disease-modifying effects of ganglioside GM1 in Huntington's disease models. *EMBO Mol Med*. 2017 Nov; 9(11): 1537–1557. Published online 2017 Oct 9. doi: 10.15252/emmm.201707763.

Mikkonen M, Soininen H, Kälviäinen R, Tapiola T, Ylinen A, Vapalahti M, Paljärvi L, Pitkänen A.

Mikkonen M, Soininen H, Tapiola T, Alafuzoff I, Miettinen R. Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease: changes in highly polysialylated NCAM immunoreactivity in the hippocampal formation. *Eur J Neurosci.* 1999 May;11(5):1754-64.

Miltenberger-Miltenyi G, Laccone F. Mutations and polymorphisms in the human methyl CpG-binding protein MECP2. *Hum Mutat.* 2003 Aug; 22(2):107-15.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389, 1998.

Nance MA¹. Genetics of Huntington disease. *Handb Clin Neurol.* 2017;144:3-14. doi: 10.1016/B978-0-12-801893-4.00001-8.

Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell.* 1995 Jun 2;81(5):811-23.

Palidwor GA, Shcherbinin S, Huska MR, Rasko T, Stelzl U, Arumughan A, Foulle R, Porras P, Sanchez-Pulido L, Wanker EE, Andrade-Navarro MA. Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput Biol.* 2009 Mar;5(3):e1000304. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000304. Epub2009 Mar 13.

Peggy C. Nopoulos, Elizabeth H. Aylward, Christopher A. Ross, James A. Mills, Douglas R. Langbehn, Hans J. Johnson, Vincent A. Magnotta, Ronald K. Pierson, Leigh J. Beglinger, Martha A. Nance, Roger A. Barker, Jane S. Paulsen, the PREDICT-HD Investigators and Coordinators of the Huntington Study Group. Smaller intracranial volume in prodromal Huntington's disease: evidence for abnormal neurodevelopment. *Brain.* 2011 Jan; 134(1): 137–142. Published online 2010 Oct 4. doi: 10.1093/brain/awq280.

Pekcec A, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Potschka H. Polysialic acid affects pathophysiological consequences of status epilepticus. *Neuroreport*. 2010 Jun 2;21(8):549-53. doi: 10.1097/WNR.0b013e328338616d.

Posse de Chaves E, Sipione S. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett*. 2010 May 3;584(9):1748-59. doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.010.

Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum Mutat* 25:324, 2005.

Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Ann Neurol*. 1998 Dec;44(6):923-34.

Ricceri L¹, De Filippis B, Laviola G. Mouse models of Rett syndrome: from behavioural phenotyping to preclinical evaluation of new therapeutic approaches. *Behav Pharmacol*. 2008 Sep;19(5-6):501-17. doi: 10.1097/FBP.0b013e32830c3645.

Rodan LH, Cohen J, Fatemi A, Gillis T, Lucente D, Gusella J, Picker JD. A novel neurodevelopmental disorder associated with compound heterozygous variants in the huntingtin gene. *Eur J Hum Genet*. 2016 Dec;24(12):1826-1827. doi: 10.1038/ejhg.2016.74. Epub 2016 Jun 22.

Rosenblatt A, Liang KY, Zhou H, Abbott MH, Gourley LM, Margolis RL, Brandt J, Ross CA. The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. *Neurology*. 2006 Apr 11;66(7):1016-20.

Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*. 2011 Jan;10(1):83-98. doi:10.1016/S1474-4422(10)70245-3.

Sandrine Humbert. Is Huntington disease a developmental disorder? *EMBO Rep*. 2010 Dec; 11(12): 899. doi: 10.1038/embor.2010.182.

Sapp E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, Vonsattel JP, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol*. 1997 Oct;42(4):604-12.

Sato C, Hane M, Kitajima K. Relationship between ST8SIA2, polysialic acid and its binding molecules, and psychiatric disorders. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1860(8):1739-52. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.04.015. Epub 2016 Apr 20.

Saudou F, Humbert S. The Biology of Huntingtin. *Neuron*. 2016 Mar 2;89(5):910-26. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.003.

Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev*. 2014 Apr;94(2):461-518. doi: 10.1152/physrev.00033.2013.

Seyfried TN¹, Heinecke KA, Mantis JG, Denny CA. Brain lipid analysis in mice with Rett syndrome. *Neurochem Res*. 2009 Jun;34(6):1057-65. doi: 10.1007/s11064-008-9874-7. Epub 2008 Nov 11.

Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Priestman DA, Neville DC, Reinkensmeier G, Wang H, Wiznitzer M, Gurtz K, Verganelaki A, Pryde A, Patton MA, Dwek RA, Butters TD, Platt FM, Crosby AH. Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet*. 2004 Nov;36(11):1225-9. Epub 2004 Oct 24.

Smeets E, Terhal P, Casaer P, Peters A, Midro A, Schollen E, van Roozendaal K, Moog U, Matthijs G, Herbergs J, Smeets H, Curfs L, Schrandt-Stumpel C, Fryns JP. Rett syndrome in females with CTS hot spot deletions: a disorder profile. *Am J Med Genet A* 132A:117-120, 2005.

Squitieri F, Griguoli A, Capelli G, Porcellini A, D'Alessio B. Epidemiology of Huntington disease: first post-HTT gene analysis of prevalence in Italy. *Clin Genet*. 2016 Mar;89(3):367-70. doi: 10.1111/cge.12574. Epub 2015 Mar 15.

Squitieri F., Andrew SE, Goldberg YP, et al. DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Hum Mol Genet* 3, 2103-2114, 1994.

Takikita S, Fukuda T, Mohri I, Yagi T, Suzuki K. Perturbed myelination process of premyelinating oligodendrocyte in Niemann-Pick type C mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Jun;63(6):660-73.

Thompson LM¹, Aiken CT, Kaltenbach LS, Agrawal N, Illes K, Khoshnan A, Martinez-Vincente M, Arrasate M, O'Rourke JG, Khashwji H, Lukacsovich T, Zhu YZ, Lau AL, Massey A, Hayden MR, Zeitlin SO, Finkbeiner S, Green KN, LaFerla FM, Bates G, Huang L, Patterson PH, Lo DC, Cuervo AM, Marsh JL, Steffan JS. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J Cell Biol*. 2009 Dec 28;187(7):1083-99. doi: 10.1083/jcb.200909067. Epub 2009 Dec 21.

van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *Lancet Neurol*. 2008 Oct;7(10):939-50. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70215-1.

Varea E, Guirado R, Gilabert-Juan J, Martí U, Castillo-Gomez E, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J. Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *J Psychiatr Res*. 2012 Feb;46(2):189-97. doi: 10.1016/j.jpsychires.2011.10.011. Epub 2011 Nov 17.

Verheijen FW, Verbeek E, Aula N, Beerens CE, Havelaar AC, Joosse M, Peltonen L, Aula P, Galjaard H, van der Spek PJ, Mancini GM. A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet*. 1999 Dec;23(4):462-5.

Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SM. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Mar;68(1):132-53.

Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985 Nov;44(6):559-77.

Wang B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu Rev Nutr*. 2009;29:177-222. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155515.

Wang C, Rougon G, Kiss JZ. Requirement of polysialic acid for the migration of the O-2A glial progenitor cell from neurohypophyseal explants. *J Neurosci*. 1994 Jul;14(7):4446-57.

Weaving, L.S., Ellaway, C.J., Gecz, J., Christodoulou, J. Rett syndrome: clinical review and genetic update. *J. Med. Genet.* 42, 1–7 2005.

Young JI, Hong EP, Castle JC, Crespo-Barreto J, Bowman AB, Rose MF, Kang D, Richman R, Johnson JM, Berget S, Zoghbi HY. Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17551-17558, 2005.

Zeitlin S¹, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet*. 1995 Oct;11(2):155-63.

Zuber C, Lackie PM, Catterall WA, Roth J. Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem*. 1992 May 15;267(14):9965-71.

Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*. 2001 Jul 20;293(5529):493-8. Epub 2001 Jun 14.

Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. Loss of

huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*. 2001 Jul 20;293(5529):493-8. Epub 2001 Jun 14.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il dottor Vittorio Maglione, mio mentore, per i preziosi insegnamenti, per la passione e per l'amore che mi ha trasmesso verso la ricerca.

Ringrazio sentitamente la dottoressa Alba Di Pardo, che ogni giorno mi ha spinto a dare sempre il meglio di me, insegnandomi ad osservare le cose sempre con occhio critico.

Ringrazio la professoressa Daniela Carnevale per la sua piena e sincera disponibilità.

Inoltre, desidero ringraziare il dottor Maurizio D'Esposito per avermi fornito il modello murino della Sindrome di Rett, il dottor Thomas Boltje per aver sintetizzato le molecole necessarie ai trattamenti animali e il professor Emiliano Bedini per avermi accolto nel suo laboratorio, seppur per breve periodo.

Intendo poi esprimere la mia sincera gratitudine ai miei colleghi e amici di laboratorio, Federico, Enrico, Luca, Salvatore, Elena e Susy per i numerosi consigli e per la loro solidarietà.

Infine, ho desiderio di ringraziare con affetto la mia famiglia per il sostegno ed il grande aiuto che mi hanno dato durante questi anni di lavoro e di studio.