



**Università degli Studi di Cagliari**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE**

**Ciclo XXIII**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO16

**Marker di Neuroinfiammazione nella malattia di  
Alzheimer: studio su tessuto cerebrale umano e su ratti  
transgenici McGill-R-Thy1-APP**

**Presentata da: Dott.ssa Tiziana Melis**

**Coordinatore Dottorato: Prof.ssa Veleria Sogos**

**Tutor: Prof.ssa Marina Del Fiacco**

**Esame finale anno accademico 2009 - 2010**

*Alla mia famiglia*

# INDICE

1. INTRODUZIONE .....	7
1.1. La Malattia di Alzheimer.....	7
1.1.1. Epidemiologia.....	7
1.1.2. Cenni Storici .....	8
1.1.3. Caratteristiche morfologiche della patologia .....	9
1.1.4. Fattori di rischio.....	14
1.2.5. Evoluzione della patologia .....	16
1.1.6. Evoluzione clinica .....	17
1.2. Alzheimer e Neuroinfiammazione .....	18
1.2.1. Aspetti generali .....	18
1.2.3. Oligomeri di A $\beta$ e neuroinfiammazione .....	22
1.2.4. La proteina Cluster of Differentiation 40 (CD40) .....	23
1.2.5. La Metalloproteasi di matrice 9 (MMP-9).....	25
1.2.6. Complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHCII) .....	26
1.2.7. Stress Ossidativo.....	27
2. RAZIONALE DEL PROGETTO E SCOPO DELLA RICERCA .....	34
3. MATERIALI E METODI .....	37
3.1. CAMPIONI .....	37
3.1.1. Campioni umano.....	37
3.1.2. Campioni di ratto.....	37
3.2. METODI.....	38
3.2.1. Western Blot.....	38

3.2.2. Zimografia .....	39
3.2.3. ELISA .....	39
3.2.4. Iniezioni bilaterali di A $\beta$ nell'ippocampo .....	40
3.2.5. Preparazione degli oligomeri di A $\beta$ .....	40
3.2.6. Raccolta del liquido cerebrospinale (CSF) .....	40
3.2.7. Zimografia in situ e Immunoistochimica .....	41
3.2.8. Analisi statistica dei dati .....	42
4. RISULTATI .....	43
4.1. CERVELLO UMANO .....	43
4.1.1. MMP-9 .....	43
4.1.2. CD40 .....	48
4.1.3. Complesso maggiore di istocompatibilità di classe ii (MHCII) .....	50
4.1.4. Forma inducibile dell'enzima no-sintetasi (iNos) .....	53
4.1.5. Interferone gamma (IFN $\gamma$ ) .....	56
4.2. CAMPIONI DI .....	60
4.2.1. MMP-9 nel liquido cerebrospinale .....	60
4.2.2. Espressione di MMP-9 nel CSF di nei ratti transgenici McGill-R-Thy1-APP. ....	61
4.2.3. Immunoistochimica e Zimografia in situ per MMP-9 .....	61
5. DISCUSSIONE .....	63
BIBLIOGRAFIA .....	71
Ringraziamenti .....	81

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. La Malattia di Alzheimer

### 1.1.1. Epidemiologia

La malattia (o morbo o demenza) di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da una progressiva distruzione delle cellule neuronali e conseguente declino cognitivo, che rende incapaci di una vita normale le persone che ne sono affette. Si calcola che solo in Italia ne soffrano circa 800.000 persone e nel mondo 26.6 milioni, ma tali stime sembrano destinate ad una crescita esponenziale. Studi epidemiologici hanno dimostrato una stretta correlazione tra l'incidenza della patologia e l'età (Brayne and Calloway, 1988). Studi condotti sulla popolazione europea rivelano che ogni anno vengono diagnosticati 2,5 casi ogni 1.000 persone nella fascia di età compresa tra i 65 e 69 anni; la casistica sale a 9 casi diagnosticati su 1.000 tra persone di età tra i 75 ed i 79 anni e a 40,2 casi su 1.000 persone tra gli 85 e gli 89 anni (Bermejo-Pareja et al., 2008). Definita anche "demenza di Alzheimer" (AD), viene appunto catalogata tra le demenze, essendo un deterioramento cognitivo cronico progressivo. Tra tutte le demenze quella di Alzheimer è la più comune, rappresentando l'80-85% di tutti i casi di demenza (Bermejo-Pareja et al., 2008). La patologia colpisce le aree del Sistema Nervoso Centrale (SNC) coinvolte nell'elaborazione del pensiero, della memoria e del linguaggio, con una graduale alterazione di tutte le più alte funzioni mentali. L'evolversi della malattia porta ad alterazioni della personalità, comportamenti bizzarri e perdita del controllo delle funzioni corporee.

Nonostante i costanti progressi della scienza, attualmente solo un'analisi post-mortem dei tessuti cerebrali consente di ottenere una corretta e sicura diagnosi mediante riscontri anatomo-patologici che possano confermare una precedente valutazione clinica. L'eziologia della malattia non è nota, sebbene diversi fattori di rischio siano stati identificati. Nella forma più comune del morbo, nota come Alzheimer ad insorgenza tardiva (tardive, late-onset Alzheimer), la mutazione del gene dell'apolipoproteina E (Apo E) sul cromosoma 19 rappresenta un fattore di rischio ormai riconosciuto dalla comunità scientifica (Poirer et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). In quelle forme patologiche definite come precoci o giovanili (early-onset Alzheimer), che affliggono circa il 5% della popolazione dei malati di Alzheimer, la familiarità genetica gioca un ruolo importante (Betram and Tanzi, 2004). Oltre alla predisposizione

genetica, anche altri fattori, quali l'alimentazione, lo stile di vita, l'educazione, il genere, possono avere un ruolo nell'insorgenza della malattia. Nonostante tutto, per quanto diverse teorie siano state proposte per spiegare i processi cellulari e molecolari che determinano il sopraggiungere della malattia, i meccanismi che rendono particolarmente vulnerabili i neuroni coinvolti nei processi di memoria e apprendimento rimangono completamente sconosciuti e ancora oggetto di studio.

### 1.1.2. Cenni Storici

Nel 1906, il medico tedesco Alois Alzheimer (Fig.1), che lavorava in un ospedale di Francoforte, descrisse e presentò per la prima volta le caratteristiche cliniche e neuropatologiche della malattia. Alzheimer documentò il caso di una donna di 51 anni, Auguste D., che presentava gravi disturbi cognitivi relativi alla memoria e al linguaggio, e di interazione sociale. A seguito della morte di Auguste, sopraggiunta nell'aprile del 1906, il Dr Alzheimer eseguì una serie di indagini e valutazioni che portarono all'identificazione delle caratteristiche anatomiche e neuropatologiche tipiche della malattia (Alzheimer A, 1907). A livello macroscopico, la malattia era caratterizzata da una diminuzione nel peso e nel volume del cervello, dovuta ad atrofia corticale, con evidente allargamento dei solchi e corrispondente appiattimento delle circonvoluzioni. A livello microscopico e cellulare, erano riscontrabili impoverimento neuronale, accumuli di materiale extracellulare in forma di placche, e ammassi neurofibrillari intraneuronali (Alzheimer A, 1907).

Negli anni successivi vennero segnalati nella letteratura scientifica undici altri casi simili. Nel 1910 la patologia venne inserita per la prima volta dallo psichiatra tedesco Emil Kraepelin nel suo classico *Manuale di Psichiatria*, con la definizione di "Malattia di Alzheimer" o "Demenza Presenile". Nel 1970, Tomlinson, Beato e Roth (Tomlinson et al.,1968; Tomlinson et al.,1970) individuarono una significativa correlazione tra il declino cognitivo e le lesioni presenti nel tessuto nervoso dei pazienti affetti dal morbo. Prima della scoperta di Alzheimer, gli scienziati e la comunità non-scientifica consideravano la demenza come una "naturale" evoluzione dell'età, che veniva accettata come una normale fase del processo d'invecchiamento. Ora invece, la comunità medica riconosce formalmente il morbo di Alzheimer come una condizione patologica e non una tappa transitoria del ciclo vitale. Inizialmente, il termine "malattia di Alzheimer" fu utilizzato solo per le rare forme "early-onset", con esordio clinico prima dei 65 anni; dopo il 1976 tale termine è stato ufficialmente esteso a tutte le forme di Alzheimer (Katzman, 1976; 1986 ). A metà degli anni 60, grazie alla microscopia elettronica, Robert Terry e Michael Kidd investigarono la natura degli aggregati presenti a livello cerebrale. Lavorando in modo indipendente, dimostrarono che gli

ammassi neurofibrillari (NFT) erano costituiti da proteina tau iperfosforilata, associata ai microtubuli, con filamenti intrecciati a formare una struttura elicoidale (Terry, 1963; Kidd, 1964). In seguito, Glenner e Wong (1984) individuarono nella proteina amiloide il principale costituente delle placche senili (Glenner and Wong, 1984).

Nel corso del secolo scorso, l'interesse crescente e l'esponenziale crescita della popolazione colpita dal morbo di Alzheimer hanno determinato un forte sviluppo della ricerca in questo campo. Negli ultimi dieci anni, l'individuazione di potenziali fattori di rischio ambientali, genetici e di altro genere hanno consentito una maggiore comprensione dei meccanismi che determinano la formazione delle placche e degli ammassi neurofibrillari. Lo studio genetico della patologia ha portato all'individuazione di specifici geni coinvolti nelle forme ad esordio precoce e tardivo della patologia (Poirer et al., 1993; Strittmatter et al., 1993; Betram and Tanzi, 2004) Purtroppo i fattori di rischio genetici da soli non possono fornire una spiegazione completa. Sono passati più di cento anni dalla sua scoperta e attualmente la malattia di Alzheimer è ancora ad eziologia sconosciuta e incurabile. I farmaci in uso trattano solo i sintomi e consentono solo un rallentamento nella progressione del declino cognitivo. La sua ampia e crescente diffusione nella popolazione, l'assenza di una valida terapia, e le pesanti conseguenze in termini di risorse necessarie (emotive, organizzative ed economiche), che ricadono sui familiari dei malati, la rendono una delle patologie a più grave impatto sociale del mondo.



Fig.1 Alois Alzheimer

### 1.1.3. Caratteristiche morfologiche della patologia

Diverse sono le alterazioni morfologiche macroscopiche e microscopiche caratteristiche della malattia di Alzheimer. Come già accennato in precedenza, all'esame macroscopico, il tratto distintivo è la notevole atrofia, simmetrica e diffusa, con ampliamento sia dei solchi che dei ventricoli e con appiattimento delle

circonvoluzioni cerebrali (Alzheimer A, 1907) (Fig. 2a). Si osserva una diffusa perdita di massa neuronale a livello della corteccia cerebrale, del cervelletto, dei gangli della base, del tronco encefalico e del midollo spinale. In particolare tale depauperamento interessa alcune specifiche regioni dell'encefalo come il nucleo basale di Meynert (substantia innominata), i nuclei del setto e la banda (o benderella) diagonale di Broca. La diminuita concentrazione di acetilcolina che si osserva nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer (Davis and Maloney, 1976) sarebbe dovuta alla perdita neuronale in tali nuclei, responsabili di proiezioni colinergiche a tutta la corteccia (Whitehouse et al 1982). A livello microscopico, particolarmente significativo appare il depauperamento sinaptico, che risulta sostanziale nel determinare pesanti conseguenze funzionali poiché, compromettendo la neurotrasmissione, riduce considerevolmente le possibilità di interazione tra i neuroni.

Le due alterazioni morfologiche microscopiche ritenute più rilevanti della malattia di Alzheimer sono le placche senili o placche amiloidi (Fig. 2b), costituite da accumuli del peptide beta-amiloide ( $A\beta$ ), e i grovigli o ammassi neurofibrillari (neurofibrillary tangles, NFT) (Fig. 2c), costituiti da accumuli di proteina tau. Queste due modificazioni vengono considerate patognomoniche, ovvero la loro presenza risulta indispensabile per porre diagnosi di demenza di Alzheimer. Sia le placche senili che gli ammassi neurofibrillari appaiono distribuiti nel cervello secondo una specifica topografia. Le placche senili sono costituite da materiale proteinaceo depositato in sede extracellulare, mentre i grovigli neurofibrillari sono costituiti da accumuli citoplasmatici di componenti del citoscheletro con caratteristiche modificazioni strutturali. Tratto distintivo della malattia di Alzheimer è la presenza delle placche nella corteccia entorinale e nell'ippocampo, e sembra che queste si formino prima dei grovigli neurofibrillari.

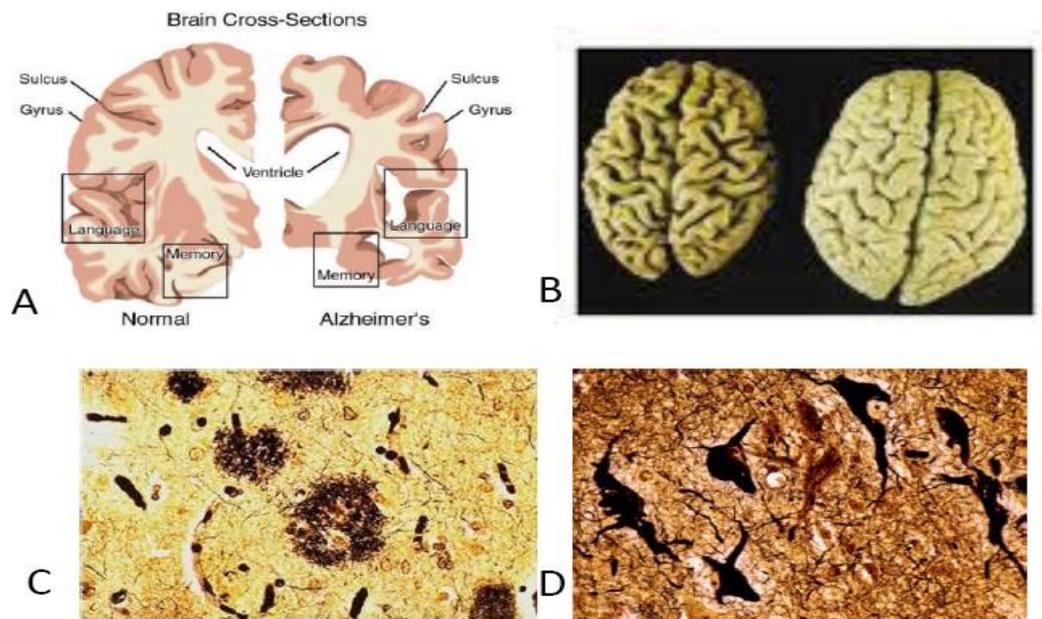


Fig.2 **A e B**: Confronto tra individuo sano e malato di Alzheimer. Visibili atrofia corticale diffusa e allargamento compensatorio dei ventricoli. **C** : Placche senili. **D**: Grovigli neuro fibrillari.

### Placche senili

Le placche di sostanza amiloide hanno forma irregolare, approssimativamente sferica, e dimensioni molto variabili da dieci a parecchie centinaia di micrometri. Sono depositi extracellulari del peptide beta-amiloide ( $A\beta$ ), caratterizzate da un nucleo denso circondato da neuriti dalla morfologia alterata. Come detto in precedenza, la natura stessa delle placche è stata per lungo tempo sconosciuta. Glenner e Wong (1984) furono in grado di sciogliere i depositi e isolare le forme alfa e beta del peptide amiloide, costituite rispettivamente da 40 e da 42 amminoacidi (Glenner and Wong, 1984). Il peptide beta-amiloide ( $A\beta$ ) deriva dalla più grande proteina precursore dell'amiloide (APP), il cui gene è localizzato sul cromosoma 21. Inizialmente si credeva che  $A\beta$  potesse essere il risultato di una scissione anomala di APP (Selkoe et al., 1994; Selkoe et al., 2000). Tuttavia, Hass e il suo gruppo (1992) dimostrarono che  $A\beta$  era normalmente prodotta durante il metabolismo di APP. APP è una proteina integrale di membrana espressa in cellule neuronali, ma anche in cellule non neuronali, in individui sani o affetti dalla malattia di Alzheimer. E' costituita da un dominio amino-terminale extracellulare, da una singola porzione trans-

membrana e da una corta coda carbossi-terminale intracellulare (Selkoe, 2001). La sua principale funzione non è ancora conosciuta, sebbene evidenze scientifiche suggeriscano un possibile ruolo nei processi di plasticità sinaptica, modulazione della crescita assonale e regolazione dei livelli intracellulari di calcio (Barger et al., 1993; Beher et al., 1996; Priller et al., 2006).

L'APP è processata attraverso due vie proteolitiche principali, una definita via amiloidogena a causa della conseguente produzione del peptide A $\beta$ , mentre la seconda è definita non amiloidogena (Fig. 3). Dal momento che i prodotti di queste due vie si escludono a vicenda, le secretasi coinvolte in questi processi competono per il substrato APP. Nella via non-amiloidogena, la proteina matura APP viene scissa proteoliticamente da una  $\alpha$ -secretasi. Il taglio enzimatico, sulla porzione extracellulare, determina il rilascio di un frammento NH<sub>2</sub>-terminale chiamato  $\text{APP}\alpha$  e la conservazione della porzione COOH-terminale ancora ancorata alla membrana. Quest'ultima potrà essere ulteriormente processata con l'intervento di una  $\gamma$ -secretasi, con il rilascio di un piccolo segmento proteico chiamato P3. In alternativa, il peptide APP può essere processato attraverso la via amiloidogena. In questa seconda via il rilascio del peptide amiloide è mediato dall'azione sequenziale di due secretasi  $\beta$  e  $\gamma$  (Cai et al., 2001; Tabaton et al., 2010). Il primo enzima,  $\beta$ -secretasi, effettua il primo taglio sulla porzione extracellulare in corrispondenza dell'aminoacido in posizione 671, rilasciando il peptide  $\text{APP}\beta$ . Successivamente, la  $\gamma$ -secretasi agisce sul dominio trans-membrana per effettuare il secondo taglio e il rilascio del peptide A $\beta$ . A seconda del punto di taglio, il peptide A $\beta$  può avere una lunghezza di 40 o di 42 aminoacidi (Selkoe, 1996; Vassar et al, 1999; Hardy, 2001). Almeno sette differenti mutazioni del gene APP causano forme familiari di AD a esordio precoce (Hardy, 2001). Esse sono tutte mutazioni che danno origine alla sostituzione di un singolo aminoacido, localizzate a livello dei siti di taglio delle  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi. Queste mutazioni alterano la proteolisi normale di APP producendo nel cervello di pazienti AD un incremento del deposito extracellulare di A $\beta$  (A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, o solo di A $\beta$ 42) (Selkoe, 1996).

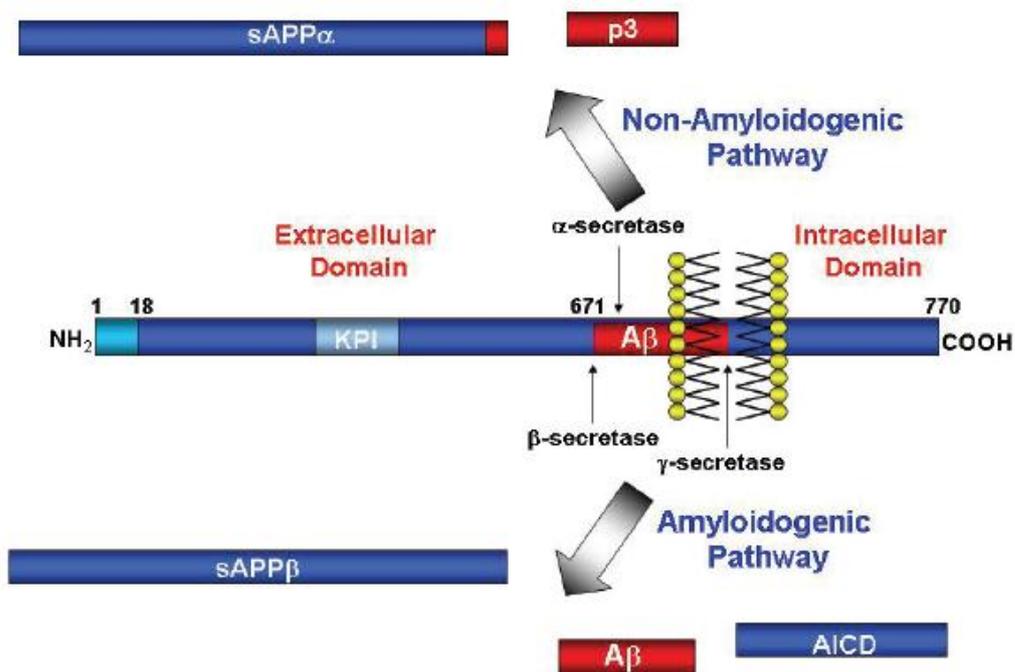


Fig.3 Rappresentazione schematica della processazione di APP: via amiloidogena vs via non-amiloidogena.

In seguito a rilascio neuronale, i monomeri di Aβ, in particolare il più tossico Aβ<sub>1-42</sub>, iniziano a depositarsi nello spazio extracellulare costituendo strutture sovra-ordinate: dimeri, trimeri, oligomeri, protofibrille, fibrille e infine placche amiloidi (Iwatsubo et al., 1994). Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, le placche non sono strutture statiche, ma sono sottoposte a continui processi di rimodellamento. La classificazione morfologica ci consente di discriminare tra placche diffuse, classiche e compatte (Armstrong, 1998). Le placche diffuse caratterizzano le prime fasi della patologia e sono descritte come depositi amorfi e immaturi. Sono costituite principalmente da un nucleo di Aβ<sub>1-42</sub> circondato perimetralmente da cellule gliali coinvolte nei processi di degradazione della placca stessa e nella formazione di neuriti distrofici. Le placche classiche sono costituite quasi esclusivamente da un nucleo condensato di Aβ fibrillare con una corona di neuriti distrofici, anche in questo caso circondato da cellule gliali. Infine, le placche compatte, rare, sono morfologicamente simili alle placche classiche ma in esse sono assenti le cellule gliali a corona (Armstrong, 1998).

Le placche amiloidi sono particolarmente numerose nella sostanza grigia della neocorteccia e dell'ippocampo, ma si osservano anche nei gangli della base, nel talamo e nel cervelletto. La densità

delle placche senili, però, non è proporzionale alla gravità della demenza, e la loro presenza è riscontrabile anche nel cervello di individui anziani non dementi.

#### Grovigli neurofibrillari

I grovigli o ammassi neurofibrillari o NFT (neurofibrillary tangles) sono comunemente associati al morbo di Alzheimer, ma sono descritti anche in una serie di malattie neurodegenerative generalmente riportate sotto il nome di "taupatie". La deposizione di aggregati di proteine tau può rappresentare un evento precoce della patologia, con localizzazione primaria nei neuroni della corteccia transentorinale, seguita dall'ippocampo e dall'amigdala, e infine dalla corteccia neopalliale.

I grovigli neurofibrillari sono composti principalmente dalla forma iperfosforilata di tau, proteina associata ai microtubuli. Tau appartiene alla famiglia delle proteine dette MAP (microtubule-associated proteins). E' coinvolta nella stabilizzazione e nell'accrescimento dei microtubuli all'interno dei neuroni, in cui è presente soprattutto nei processi assonali, ed è implicata nel trasporto assonale dei componenti subcellulari. La fosforilazione anormale di tau, da parte di una chinasi, porta a strutture molecolari costituite da filamenti proteici appaiati con disposizione elicoidale. Questo processo causa il disassemblaggio dei microtubuli; viene così ostacolato il trasporto assonale e, in definitiva, la funzionalità sinaptica e neuronale (Iqbal et al., 2005). Attualmente, studi in vivo hanno dimostrato che svariate chinasi sono in grado di fosforilare tau in vari siti, ma non è stato ancora completamente chiarito quante siano le chinasi responsabili dell'avvio del processo di iperfosforilazione. Le NFT hanno origine come strutture intracellulari localizzate all'interno del soma neuronale e dei dendriti (Peskind, 1996) (Fig. 2c), e diffondono successivamente nello spazio extracellulare.

#### 1.1.4. Fattori di rischio

E' ormai comunemente accettato che il palesarsi della patologia d'Alzheimer non sia riconducibile ad una singola causa, ma che più fattori cooperino ed interagiscano.

Nel 1993, per la prima volta, fu riportata la correlazione tra la forma sporadica di Alzheimer e l'incidenza di un particolare tipo di gene. Questo gene si trova nel cromosoma 19, ed è responsabile della produzione di una proteina chiamata apolipoproteinaE (ApoE) (Poirer et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). Esistono tre tipi principali di tale proteina, uno dei quali, l'ApoE4, sebbene poco comune, rende

più probabile il verificarsi della malattia. Le ApoE sono proteine deputate al trasporto dei trigliceridi e del colesterolo attraverso il circolo sanguigno e alla loro distribuzione ai vari organi e tessuti. Tuttavia, la presenza dell'allele ApoE4 non determina la malattia, ma ne aumenta la probabilità. Per esempio, in una persona di cinquant'anni portatrice di questo allele la probabilità di ammalarsi raddoppia. D'altra parte, soltanto nel 50 % dei malati di Alzheimer si trova la proteina ApoE4, e non tutti coloro che hanno tale proteina presentano la malattia. In effetti, non esistono strumenti atti a predire a un determinato individuo che un giorno o l'altro svilupperà la malattia.

La malattia di Alzheimer non è normalmente ereditaria. In un numero estremamente limitato di famiglie (alcune decine in tutto il mondo), la malattia di Alzheimer si presenta col carattere di malattia genetica dominante, chiamata Alzheimer familiare o FAD. La neuropatologia è simile a quella della forma sporadica, ma si presenta con esordio precoce, tra i 35 e i 60 anni, e una rapida ed infausta progressione. Nella FAD sono state identificate diverse mutazioni, che determinano una maggiore espressione del peptide amiloide, nei geni che codificano le tre proteine APP, presenilina-1 (PS-1) e presenilina-2 (PS-2). Le mutazioni del gene APP (sul cromosoma 21) sono posizionate strategicamente in prossimità dei siti di scissione enzimatica. Immediatamente prima del sito di taglio della  $\beta$ -secretasi, in posizione N-terminale, una doppia mutazione facilita la reazione proteolitica della via amiloidogena, con conseguente incremento della produzione di  $A\beta$ 1-40 e  $A\beta$ 1-42 (Citron et al., 1992). Nella porzione C-terminale, sito di taglio delle  $\gamma$ -secretasi, un'altra mutazione determina un incremento della via amiloidogena con rilascio di  $A\beta$ 1-42 (Suzuki et al., 1994). La mutazione del gene PS-1, localizzato sul cromosoma 19, porta anch'essa alla produzione di elevati livelli di  $A\beta$ 1-42 con un meccanismo ancora sconosciuto, ma che presumibilmente coinvolge le  $\gamma$ -secretasi (Duff et al., 1991; Gomez-Isla et al., 1996; Citron et al., 1997; Borghi et al., 2010). Anche la mutazione del gene PS-2, localizzato sul gene 1, è stata ipotizzata una sua funzione  $\gamma$ -secretasica e si suppone un suo sinergismo con PS-1 (Avila et al., 2010).

Oltre ai fattori genetici, sono stati identificati un buon numero di fattori di rischio coinvolti nelle forme sporadiche della patologia. Tra questi, l'età gioca indiscutibilmente un ruolo chiave. Studi epidemiologici rivelano che il sesso femminile è maggiormente predisposto a tale malattia rispetto agli uomini. Inoltre, può esserci un forte legame fra trauma cranico grave e rischio di Alzheimer, soprattutto quando il trauma si presenta ripetutamente o comporta perdita di coscienza (Lye and Shores, 2000).

### 1.2.5. Evoluzione della patologia

La patologia, come suggerito da Braak e Braak (1995), evolve secondo una sequenza temporale e spaziale attraverso le strutture della corteccia temporale mediale, nuclei sottocorticali e aree neocorticali del cervello. Si riconoscono sei fasi. Nello stadio transentorinale (fasi I e II), i segni della patologia sono confinati essenzialmente alla corteccia entorinale e transentorinale, con modesto coinvolgimento delle sezioni CA1 e CA2 dell'ippocampo. Lo stadio limbico (fasi III e IV) è caratterizzato dalla presenza delle lesioni neurofibrillari nella corteccia entorinale, da grovigli moderati nell'ippocampo e dalla loro progressiva diffusione all'amigdala, al talamo e all'ipotalamo. Infine, lo stadio neocorticale (stadio V e VI) è caratterizzato dal progressivo interessamento della neocorteccia (Fig.4). La caratterizzazione clinica ha suggerito che lo stadio transentorinale rappresenta il periodo preclinico e asintomatico della malattia, mentre lo stadio limbico rappresenta la fase incipiente del morbo caratterizzato dalla comparsa dei primi sintomi clinici. Lo stadio neocorticale è caratterizzato dalla malattia pienamente conclamata (Braak and Braak, 1991).

Il passaggio da uno stadio all'altro è graduale e sequenziale. Recenti lavori suggeriscono che la presenza di grovigli neurofibrillari all'interno dei neuroni non indica necessariamente la cessazione immediata della funzione delle cellule, ma che tali neuroni possono rimanere in vita per molti anni dopo la loro comparsa (Hatanpaa et al., 1996; Morsch, 1999).

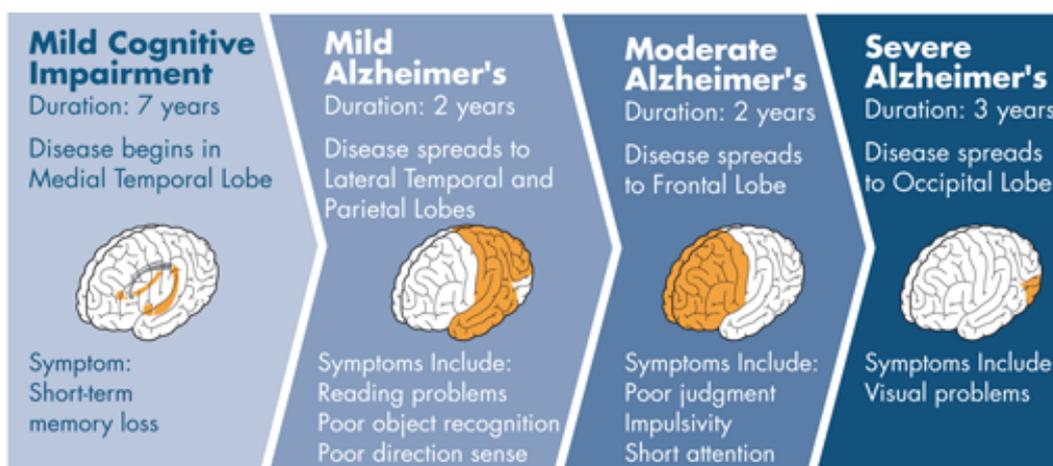


Fig.4 Evoluzione patologica caratterizzata da una progressiva diffusione di depositi amiloidi e ammassi neurofibrillari, che dalla corteccia entorinale si distribuiscono poi alla zona limbica e neocorticale.

### 1.1.6. Evoluzione clinica

La diagnosi della patologia e l'identificazione dei suoi diversi stadi evolutivi è possibile solo attraverso l'utilizzo diversi criteri di valutazione: test atti a valutare la condizione cognitiva del paziente, approfondite osservazioni cliniche, interviste dirette al malato e un'accurata anamnesi familiare. Tuttavia nessun test pre-mortem è in grado di effettuare una diagnosi clinica certa della malattia di Alzheimer. Quindi, ad ogni diagnosi clinica deve seguire un'analisi post-mortem. Questo significa che durante il decorso della malattia si può fare solo una diagnosi di Alzheimer 'possibile' o 'probabile'. Infatti solo l'autopsia può dare conferma della presenza delle tipiche lesioni, tratti distintivi della patologia.

Come in altre malattie neurodegenerative, la diagnosi precoce è molto importante sia perché offre la possibilità di trattare alcuni sintomi della malattia, sia perché permette al paziente di pianificare il suo futuro quando ancora è in grado di prendere decisioni. Purtroppo, molto spesso i sintomi si manifestano quando il sistema nervoso ha già subito danni irreversibili. Il decorso della malattia è lento e in media i pazienti possono vivere fino a 8-10 anni dopo diagnosi infausta. Di solito, si possono riconoscere tre diverse fasi della patologia: lieve, moderata e severa. La demenza di Alzheimer si manifesta con lievi problemi di memoria, ma la rapidità con cui i sintomi si acutizzano varia da persona a persona. Nel corso della malattia i deficit cognitivi si acquisiscono e possono portare il paziente a gravi perdite di memoria, a perdersi in luoghi familiari, all'incapacità di seguire delle indicazioni precise, ad avere disorientamenti sul tempo, sulle persone e sui luoghi, a trascurare la propria sicurezza personale, l'igiene e la nutrizione. I sintomi clinici iniziali non sembrano essere direttamente causati dai depositi amiloidi o dalla formazione di grovigli neurofibrillari intracellulari, ma piuttosto dalla perdita dei neuroni e, in particolare, dal depauperamento sinaptico (Hyman et al, 1984; Dekosky and Scheff, 1990; Terry et al, 1991). Col progredire della malattia, la demenza evolve da un lieve deficit mnemonico ad una diffusa insufficienza cognitiva con compromissione della lingua, correlata con una progressiva perdita di neuroni del giro temporale superiore (Gomez-Isla et al, 2008). Lo svilupparsi di grovigli neurofibrillari e il depositarsi di ammassi amiloidi sono eventi separati sia temporalmente che spazialmente durante la progressione della patologia. I disturbi cognitivi possono, tuttavia, essere presenti anche anni prima che venga formulata una diagnosi di demenza di Alzheimer, in una fase chiamata preclinica.

Attualmente, il termine più utilizzato per descrivere la fase preclinica della demenza è Mild cognitive impairment (MCI). I soggetti con MCI presentano una perdita di memoria maggiore rispetto a quella che ci si attenderebbe per l'età, ma non hanno una compromissione cognitiva e funzionale tale da poter essere diagnosticati come dementi. I criteri diagnostici più accettati per il MCI sono quelli proposti da

Petersen (1999): a) disturbo soggettivo di memoria preferibilmente confermato da una persona diversa dal soggetto; b) presenza di un deficit di memoria documentato da una prestazione a un test di memoria episodica; c) assenza di altri deficit cognitivi; d) normali abilità nelle attività del vivere quotidiano; e) assenza di demenza. Da una rassegna degli studi più importanti sul tasso di conversione da MCI a demenza (Caltagirone-Spalletta 2004) si deduce che nei soggetti con MCI questo tasso varia tra il 6 e il 25% ed è molto più alto di quello osservato in soggetti anziani normali, dove oscilla tra lo 0,3% in soggetti tra i 65 e i 69 anni e il 5,3% in soggetti compresi tra gli 85 e gli 89 anni.

## **1.2. Alzheimer e Neuroinfiammazione**

### **1.2.1. Aspetti generali**

Una volta si riteneva che il cervello fosse un “organo immunologicamente privilegiato” e che non venisse interessato da risposte immuni o da quelle infiammatorie. La presenza della “barriera ematoencefalica” svolge una funzione protettiva, contenendo e limitando l’accesso ad agenti nocivi. Questa visione del cervello come di un organo privilegiato si è drasticamente ridimensionata nell’ultimo decennio in seguito a studi sulle interazioni tra cervello e sistema immunitario. Infezioni, traumi, ictus, tossine e altri stimoli sono in grado di produrre una attivazione immediata e di breve durata del sistema immunitario innato. Già nel 1910, Fisher suppose che la deposizione di una sostanza estranea nella corteccia umana fosse in grado di indurre una reazione infiammatoria locale seguita da cambiamenti rigenerativi dei neuroni circostanti (Fisher, 1910) L’infiammazione, risposta immunitaria innata, è una reazione protettiva che favorisce l’eliminazione degli elementi nocivi (quali xenobiotici, sostanze nocive e del tessuto danneggiato) e l’avvio di specifici processi di guarigione. Numerose evidenze dimostrano un’associazione tra malattie neurodegenerative e processi di neuroinfiammazione cronica (Bok, 2005; Kuehn, 2005). Inoltre, vari studi indicano che processi infiammatori possano avere inizio tempo prima che si abbia una perdita significativa della popolazione neuronale (McGeer et al., 1994).

Molteplici riscontri supportano l’ipotesi che anche nella malattia di Alzheimer possa essere presente una componente neuroinfiammatoria. McGeer, Eikelenboom e Rogers furono i primi ricercatori a identificare chiaramente una componente infiammatoria nella AD (Eikelenboom et al., 1991; Eikelenboom et al.,

1994; McGeer et al., 1994; Rogers et al., 1996). Osservazioni istopatologiche del tessuto neuronale rivelano la presenza di cellule di astroglia e microglia attivate in prossimità dei siti di deposizione amiloide, principalmente attorno a placche senili del tipo compatto. Esami autoptici effettuati su pazienti affetti dal morbo rivelano elevati livelli di citochine pro-infiammatorie, chemochine, radicali liberi dell'ossigeno, mediatori dell'infiammazione (Perry et al., 2002). Varie evidenze hanno dimostrato che nella malattia di Alzheimer il processo infiammatorio si verifica nelle regioni cerebrali colpite dalla patologia, in cui i depositi di A $\beta$  e i grovigli neurofibrillari rappresentano stimoli evidenti per l'infiammazione (McGeer and Rogers, 1992; Wisniewski HM et al., 1990). Numerosi dati epidemiologici sembrano confermare il ruolo chiave della neuroinfiammazione nella patologia di Alzheimer. Infatti, pazienti sottoposti a trattamento cronico con ibuprofene mostravano un basso rischio di sviluppare la malattia, rivelando l'effetto preventivo del farmaci antiinfiammatori (McGeer and McGeer, 2006). Tale risultato sembrava indicare il ruolo dannoso dell'infiammazione nella fase pre-clinica del morbo e che l'inibizione dei processi flogistici poteva in qualche modo ritardare l'incidenza della malattia. Molti autori tendono a considerare l'infiammazione e lo stress ossidativo come una componente secondaria nell'evoluzione patologica. Tuttavia, Smith e collaboratori (Perry et al., 2002; Castagneta et al., 2003) proposero che lo stress ossidativo può in effetti essere un fattore iniziale di malattia. La flogosi nel cervello è caratterizzata da attivazione delle cellule gliali e dalla espressione dei principali mediatori infiammatori, come citochine e radicali liberi. In questo contesto le cellule di microglia svolgono un ruolo importante nella prima fase dell'infiammazione con un doppio meccanismo. Infatti, esse mediano il processo di guarigione attraverso la distruzione di antigeni e la fagocitosi dei tessuti danneggiati; d'altra parte, l'iperattivazione di queste cellule determina un eccessivo rilascio di fattori citotossici, con conseguenti effetti disastrosi non solo per i tessuti danneggiati, ma anche per quelli sani e principalmente sulla popolazione neuronale.

### 1.2.2. Cellule Gliali

Le cellule della glia o nevroglia costituiscono insieme ai neuroni la popolazione cellulare del sistema nervoso. Svolgono funzioni nutritive e di sostegno per i neuroni, assicurano l'isolamento dei tessuti nervosi e la protezione da corpi estranei in caso di lesioni. E' stato ormai appurato il ruolo chiave di queste cellule nei processi flogistici con particolare coinvolgimento delle cellule di microglia.

## **Astrociti**

Gli astrociti sono cellule costituenti della nevroglia del SNC, di forma stellata per la presenza di molti processi che rendono possibile il contatto con i neuroni circostanti. Gli astrociti svolgono un ruolo significativo durante le malattie infettive ed autoimmuni del SNC. Svolgono numerose funzioni: supporto biochimico delle cellule endoteliali che formano la barriera emato-encefalica, apporto di sostanze nutritive al tessuto nervoso, mantenimento dell'equilibrio ionico extracellulare, oltre ad avere un ruolo determinante nel processo di riparazione e cicatrizzazione a seguito lesioni traumatiche. In particolari condizioni fungono da cellule presentanti l'antigene (APC), acquisendo anche capacità fagocitaria. Possono esprimere un'ampia gamma di molecole neurotrofiche, come il fattore di crescita nervoso (NGF) e il fattore di crescita di derivazione gliale (GDNF). In risposta all'attivazione mediata dall'interferone possono anche esporre sulla membrana il complesso maggiore di istocompatibilità sia di tipo I che di tipo II. E' ormai comprovato il coinvolgimento degli astrociti nella patologia di Alzheimer. Come la microglia, anche gli astrociti si accumulano perimetralmente intorno ai siti di deposizione di A $\beta$ , in piccolo numero intorno alle placche di tipo diffuso mentre una più alta densità si raggiunge intorno alle placche neuritiche. Studi condotti su colture cellulari di astrociti dimostrano in primo luogo la capacità di questi ultimi di fagocitare A $\beta$  e confermano che A $\beta$  agisce su queste cellule attivandole e facilitando il rilascio di citochine pro-infiammatorie (interleuchina 6), mediatori caratteristici delle fasi acute del processo infiammatorio, ossido nitrico, interferone- $\gamma$  e il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Neuroinflammation Working Group, 2000). Il rilascio di questi fattori contribuisce alla disfunzione neuronale e al conseguente deficit cognitivo.

## **Microglia**

Le cellule della microglia hanno origine mieloide e durante l'embriogenesi migrano dal midollo osseo per colonizzare il SNC. In un adulto rappresentano circa il 20% della popolazione cellulare cerebrale. Le cellule della microglia e i macrofagi hanno origine comune e caratteristiche funzionali simili. Come i macrofagi nel resto del corpo, le cellule microgliali usano primariamente i meccanismi di fagocitosi e

citotossicità per distruggere i materiali estranei all'organismo. Microglia e macrofagi partecipano al mantenimento dell'omeostasi attraverso meccanismi pro-infiammatori tramite la secrezione di citochine e altre molecole-segnale. Il ruolo delle cellule microgliali come cellule effettrici del sistema immunitario è stato ampiamente confermato. Il loro coinvolgimento gioca un ruolo chiave nei meccanismi di difesa, ma può anche favorire la progressione della patologia. I precursori microgliali sono caratterizzati da forme ameboidi, ma al termine del processo di differenziazione, già concluso al momento della nascita, le cellule mature presentano un piccolo soma dal quale si dipartono dei processi ramificati. Normalmente, in condizioni di omeostasi, la microglia si trova in una condizione di riposo o di quiescenza, caratterizzata da una bassa espressione di recettori di superficie, da una minima attività secretoria e da ridotta capacità migratoria. Le cellule quiescenti presenti nel cervello maturo agiscono come sentinelle, sorvegliando e scandagliando il tessuto neuronale e attuando meccanismi di protezione da eventuali danni (Giulian, 1986). L'attivazione di questa popolazione in risposta a virus o batteri invasori o a lesioni del SNC determina una serie di cambiamenti morfologici (Fig. 4). Come descritto da Del Rio Hortega e Penfield (1936), le cellule di microglia della sostanza grigia diventano ipertrofiche con dilatazione del soma e retrazione dei processi ramificati. Nella sostanza bianca, le cellule diventano gonfie, sono caratterizzate dall'accumulo di prodotti mielinici, perdono i loro processi e vengono chiamate "granular fat cells".

Nello stato di attivazione la microglia acquisisce capacità ameboidi e migra verso il sito dell'insulto. Come i monociti e i macrofagi, le cellule di microglia esprimono costitutivamente un certo numero di molecole di superficie, tra i quali antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II e il recettore per il fattore di stimolazione coloniale CSF-1, responsabili sia dell'attivazione che dell'avvio della risposta infiammatoria. Le cellule di microglia sono in grado di riconoscere corpi estranei, fagocitarli, e fungere da APC, cioè da cellule presentanti gli antigeni ai linfociti T, attivandoli di conseguenza. Recettori per il frammento Fc delle immunoglobuline G e per le proteine del complemento sono coinvolti nella fagocitosi di particelle opsonizzate e sono espressi esclusivamente dalle cellule con compiti fagocitari. Molecole segnale come i fattori di stimolazione delle colonie M-CSF e GM-CSF, sembrano sostenere il reclutamento della microglia reattiva, promuovendone la migrazione al sito dell'insulto e la proliferazione (Giulian and Ingeman, 1988).

Nella malattia di Alzheimer, la deposizione di A $\beta$  determina uno stato di infiammazione cronica che promuove l'attivazione e il reclutamento delle cellule di microglia. L'evento chiave che indica la presenza di un processo infiammatorio è l'accumulo di microglia reattiva nelle zone di degenerazione (Ishii and Haga, 1984; Leber-Norad and Rogers, 1986; McGeer et al, 1989). Risultati di immunistochemica

confermano la presenza di cellule reattive attorno alle placche senili e nei tessuti circostanti (McGeer et al, 1988). Una varietà di studi in vitro ha dimostrato che A $\beta$  è in grado di agire direttamente sulla microglia stimolandola, inducendo un aumento dell'espressione degli antigeni di superficie e il rilascio di un certo numero di molecole infiammatorie come citochine e chemochine, suggerendo che la microglia sia una potenziale fonte di elementi pro-infiammatori liberati in prossimità dei siti danneggiati (McGeer; 1995). La comprensione del ruolo svolto dalla microglia nella malattia di Alzheimer è a tutt'oggi oggetto di dibattito. Infatti, nelle prime fasi, l'attivazione della microglia determina fenomeni di fagocitosi atti alla eliminazione dello stimolo dannoso, rappresentato dalla iper-produzione di A $\beta$ . Tuttavia, l'eccessiva concentrazione di A $\beta$ , dovuta ad un alterazione del metabolismo di APP, determina la conseguente incapacità delle cellule di microglia di far fronte alla sovrabbondante produzione del peptide con la sola fagocitosi. L'iperattivazione delle cellule determina il conseguente rilascio di fattori pro-infiammatori non selettivi, che, nell'intento di neutralizzare l'antigene, agiscono indistintamente anche sui neuroni sani, con effetti neurotossici e di neurodegenerazione diffusa.

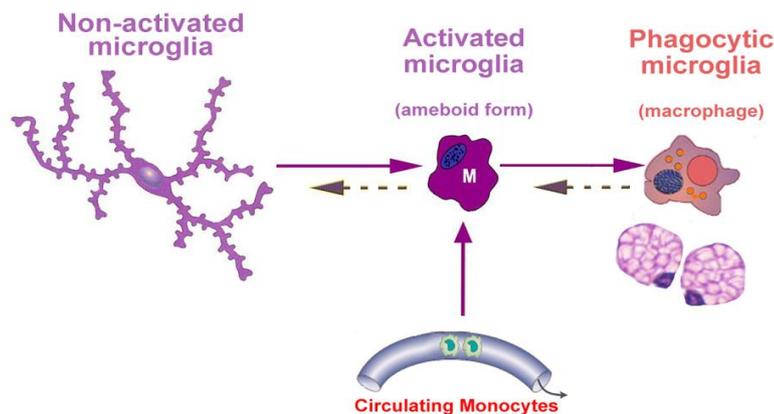


Fig.5 Rappresentazione schematica dei cambiamenti morfo-funzionali delle cellule di microglia a seguito del processo di attivazione.

### 1.2.3. Oligomeri di A $\beta$ e neuroinfiammazione

Elevati livelli di peptide A $\beta$ , caratterizzanti la patologia, accompagnano l'attivazione delle cellule di microglia e la successiva microgliosi. L'attivazione della microglia rappresenta un evento precoce nella

patologia, come è stato osservato in alcuni modelli animali transgenici in cui l'attivazione della microglia avviene già nelle fasi precedenti alla deposizione amiloide e già dai primi due mesi di età è possibile riscontrare microglia reattiva intorno alle placche amiloidi (Heneka et al., 2010). Nel tentativo di individuare i meccanismi che portano all'attivazione delle cellule microgliali, lo studio delle interazioni tra proteina amiloide e le suddette cellule rappresenta attualmente uno dei più attivi campi d'indagine. In accordo con la teoria della neuroinfiammazione, gran parte di questi studi sono focalizzati sulla misurazione dei livelli di varie neurotossine e molecole pro-infiammatorie rilasciate dalla microglia in risposta alla stimolazione di A $\beta$  e sono volti alla identificazione di possibili recettori amiloidi sulle cellule di microglia (Rogers et al., 2001; 2002). A $\beta$  viene prodotta in modo continuo dal cervello non solo nei soggetti malati, ma anche in individui sani (Sjogren M et al., 2001). In individui sani, il peptide amiloide viene catabolizzato e quindi rimosso prima che le fibrille amiloidi possano accumularsi nello spazio extracellulare. Nella malattia di Alzheimer i processi di produzione e catabolismo sembrano essere alterati, causando un accumulo anomalo di A $\beta$ . Infatti, sembra che l'anomalia possa essere determinata da una eccessiva produzione di peptide amiloide e da una conseguente incapacità delle cellule di neuroglia di smaltire la produzione in eccesso (Graham et al., 1996). Recenti studi hanno dimostrato che il tessuto cerebrale risulta particolarmente sensibile agli oligomeri di A $\beta$ , in particolare nella forma di trimeri e tetrameri (Klein et al., 2004). Oligomeri e fibrille possono interagire con la microglia attraverso specifici recettori di membrana. Legandosi alla membrana neuronale, essi inducono la formazione di canali ionici, chiamati canali A $\beta$ , provocando efflusso di potassio, attivazione dell'infiammazione e la secrezione di interleuchina 1 $\beta$  ( Halle et al., 2008; Lorenzo et al., 1994). Nel corso di questi ultimi decenni è diventato chiaro che le cellule di microglia sono dotate di una vasta gamma di recettori di membrana in grado di mediare il riconoscimento specifico di A $\beta$ , chiamati *Pattern-Recognition Receptors* (PRR), tra cui i recettori Toll 2 e 4 e il recettore FPRL1 (FPR-like 1) della famiglia dei recettori FPR (Formylpeptide Receptor) per il tripeptide formilato di origine batterica fMLP. Il legame tra A $\beta$  e il PRR è in grado di innescare l'attivazione della microglia.

#### 1.2.4. La proteina Cluster of Differentiation 40 (CD40)

Il CD40 (Cluster of Differentiation 40) è una glicoproteina transmembrana di 48 kDa, che appartiene alla superfamiglia dei recettori del TNF $\alpha$ . È espresso sulla superficie di una varietà di cellule: APC, macrofagi, cellule epiteliali, progenitori emopoietici e linfociti B. Il ligando per CD40, CD154 (o CD40L),

una proteina integrale di membrana del peso molecolare di 38 KDa, è espresso su linfociti T attivati, linfociti B attivati e piastrine attivate. Inoltre, durante la risposta infiammatoria altri tipi di cellule come monociti, cellule dell'endotelio vascolare e del muscolo liscio sembrano esprimere CD154. CD40 ha un ruolo chiave nel governare l'immunità umorale e cellulo-mediata. Sui linfociti B, il legame CD40/CD154 in presenza di citochine può indurre una profonda espansione clonale e differenziazione in plasmacellule. Sulle APC, l'attivazione di CD40 può indurre maggiore abilità nella presentazione dell'antigene, produzione di citochine e aumentata sopravvivenza. Su entrambi i tipi cellulari induce l'espressione di molecole co-stimolatorie, che inducono i linfociti T a espandersi e differenziarsi.

La presenza del recettore CD40 è stata dimostrata su una varietà di cellule del SNC, tra cui cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, astroglia e microglia; inoltre, sembra che su molte di queste cellule, l'espressione di CD40 sia incrementata a seguito di stimoli pro-infiammatori (Town et al., 2001). Crescenti evidenze sostengono il ruolo dell'interazione ligando-recettore CD40 nella patogenesi della AD (Town et al., 2001). Esperimenti condotti in vitro su colture di microglia dimostrano che il peptide A $\beta$  solubile stimola le cellule microgliali e induce un' aumentata espressione del recettore CD40 sulla loro superficie (Tan et al., 1999). Inoltre, la stimolazione di co-culture microglia e neuroni con A $\beta$  e il trattamento con il ligando CD154 determina l' aumento del rilascio del TNF- $\alpha$  e l'induzione del danno neuronale (Tan et al., 1999). In modelli transgenici di topo con una ridotta espressione del ligando CD154 si osserva una riduzione dell'attivazione microgliale mediata da A $\beta$  e questo suggerisce un ruolo chiave dell'interazione CD40-CD40L nei meccanismi di attivazione della microglia (Tan et al., 1999). E' stato dimostrato che nella malattia di Alzheimer questa diade ligando-recettore agisce in modo sinergico con il peptide  $\beta$ -amiloide per promuovere l'attivazione della microglia (Tan et al., 2002). Tutti questi elementi sembrano indicare il coinvolgimento del recettore CD40 nel processo infiammatorio, con un ruolo chiave nell'attivazione microgliale. Altre prove a sostegno del ruolo chiave di questa diade arrivano da esperimenti condotti su tessuti umani di pazienti affetti da AD. Infatti, il pattern di espressione di queste proteine è alterato nel cervello di pazienti AD così come in diversi modelli animali di Alzheimer (Calingasan et al., 2002; Togo et al., 2000). E' stato inoltre riportato che in topi transgenici che esprimono una forma non funzionale del ligando per CD40, si verifica una riduzione del deficit cognitivo e dei fenomeni di gliosi (Tan et al., 2002); il trattamento con l'anticorpo specifico anti-CD154, che impedisce al ligando di legarsi al recettore e attivarlo, in animali mutati sia per il gene APP che per quello della PS-1 determina un miglioramento cognitivo (Todd Roach et al., 2004).

### 1.2.5. La Metalloproteasi di matrice 9 (MMP-9)

Le metalloproteasi di matrice (MMP) sono una famiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti altamente regolate. Sono state identificate 24 diverse metalloproteasi, classificate in 6 gruppi sulla base della loro sequenza amminoacidica e dei substrati con i quali interagiscono (Steteler-Stevenson *et al.* 1993; Nagase & Woessner 1999). Sono secrete come proenzimi (pro-MMP), in cui l'atomo di zinco presente nel sito catalitico non è disponibile alla formazione di legami per la presenza di una cisteina (Visse and Nagase, 2003), e necessitano di un'attivazione extracellulare per iniziare l'attività proteolitica. L'attivazione, che deriva dall'esposizione del sito catalitico, può avvenire per l'azione proteolitica da parte della plasmina o altre MMP (Visse and Nagase, 2003). Una volta attivate, le MMP possono essere inibite da un'altra famiglia di proteine, gli inibitori tissutali delle MMP (TIMP), anch'essi largamente distribuiti nei tessuti (Salamonsen *et al.*, 2000). L'espressione delle MMP è regolata a livello trascrizionale da mediatori infiammatori, tra cui citochine e diversi fattori di crescita: appare quindi evidente uno stretto legame tra infiammazione e MMP (Clutterbuck *et al.*, 2010).

Le MMP sono capaci di degradare la maggior parte, se non tutte, le componenti della matrice extracellulare (MEC), nel cui rimodellamento giocano un ruolo importante, sia nei processi fisiologici (come nella normale crescita), che in processi patologici (come nella distruzione di tessuto o nella crescita abnorme di esso) (Rodgers *et al.*, 1994).

Le MMP, modulate dai TIMP, portano alla degradazione della matrice, svolgendo un'importante funzione strutturale. L'equilibrio dinamico che sottostà all'attività di MMP e TIMP è di cruciale importanza nei processi fisiologici. Ogni alterazione di questo equilibrio può avere conseguenze a livello locale e sistemico (Clutterbuck *et al.*, 2010).

Grazie alla loro attività proteolitica, le MMP sono in grado di svolgere diverse attività biologiche conseguenti alla liberazione dalla MEC di molecole o frammenti di esse (McCawley *et al.*, 2001). Di notevole importanza è il loro ruolo nella proliferazione cellulare. Parecchi fattori di crescita presentano un'affinità per le componenti della matrice: la proteolisi di tali componenti porta alla solubilizzazione dei fattori di crescita stessi (McCawley *et al.*, 2001). Talvolta le MMP agiscono direttamente sui fattori di crescita, attivandoli: MMP-2 e -9 convertono il TGF- $\beta$  nella sua forma attiva e MMP-2, -3 e -9 trasformano il precursore dell'interleuchina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) nella sua forma attiva (McCawley *et al.*, 2001).

Le MMP entrano in gioco anche nella migrazione cellulare. La migrazione è un meccanismo complesso che richiede la regolazione simultanea sia delle interazioni cellula-cellula, sia di quelle cellula-matrice. L'attività proteolitica delle MMP favorisce la rimozione dei siti di adesione delle cellule alla matrice o alla

membrana basale, o altera i dispositivi giunzionali, portando alla migrazione cellulare. (McCawley *et al.*, 2001). Come nella proliferazione, anche in questo caso l'azione delle MMP è diversificata. Le MMP sono capaci di generare stimoli chemotattici, come nel caso del rilascio dipendente da MMP-9 di VEGF (vascular endothelial growth factor), coinvolto nello sviluppo delle ossa lunghe, o al contrario di sopprimerli, come ad esempio MMP2 che scinde e inattiva MCP-3 (monocyte chemoattractant protein), diminuendo la chemiotassi e la risposta infiammatoria (McCawley *et al.*, 2001). Un ulteriore ruolo attribuito alle MMP è la comunicazione intercellulare: esse consentono il rilascio di fattori che agiscono per via paracrina, influenzando il comportamento delle diverse tipologie cellulari. La mediazione delle MMP nella comunicazione intercellulare è stata dimostrata sia durante la risposta infiammatoria, sia nell'interazione fra cellule procariote ((McCawley *et al.*, 2001).

Prove crescenti indicano che metalloproteasi della matrice (MMP) possano svolgere un ruolo importante e complesso nelle malattie neurodegenerative, inclusa la patologia di Alzheimer (Miners *et al.*, 2008). Inoltre, evidenze sperimentali suggeriscono che A $\beta$  giochi un ruolo nell'induzione dell'espressione delle MMP gliali e neuronali, la cui attività risulta essere strettamente correlata al metabolismo di A $\beta$  (Deb and Gottschall, 1996; Talamagas *et al.*, 2007).

Nella malattia di Alzheimer, elevati livelli di MMP-9 sono stati identificati nel plasma rispetto ai controlli di pari età (Lorenzi *et al.*, 2003) e nell'ippocampo dell'uomo (Backstrom *et al.*, 1996). L'espressione della MMP9 è elevata nel tessuto cerebrale e mostra una localizzazione specifica intorno alle placche amiloidi e ai grovigli neurofibrillari (Asahina *et al.*, 2001; Backstrom *et al.*, 1996) e la MMP-9 può degradare APP (Backstrom *et al.*, 1996) e fibrille  $\beta$ -amiloidi, suggerendo un ruolo nella *clearance* di A $\beta$  (Yan *et al.*, 2006). Recentemente è stato dimostrato che l'espressione della MMP-9 nell'ippocampo favorisce la disfunzione cognitiva indotta da A $\beta$  (Mizoguchi *et al.*, 2009)

#### 1.2.6. Complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHCII)

Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) è il prodotto di un gruppo di geni polimorfici localizzati sul cromosoma 6, appartenenti alla superfamiglia dei geni per le Ig e soggetti a ricombinazione genica. Le proteine MHC sono espresse sulla membrana delle cellule eucariotiche e sono coinvolte nei meccanismi di riconoscimento e differenziazione tra self e non-self. Nell'uomo l'MHC è rilevabile anche nei leucociti e per questo motivo prende il nome di HLA (human leukocytes antigen). Si distinguono due categorie di MHC, dette di classe I e di classe II. L'espressione di queste molecole sulla superficie

cellulare varia a seconda dello stato di attivazione della cellula stessa e della presenza o meno di alcune interleuchine e/o interferoni. Nonostante la struttura simile e la comune capacità di presentare l'antigene ai linfociti-T, esistono tra queste due classi nette differenze. L'MHC di classe I è costituito dagli HLA-A, -B e -C, localizzati su tutte le cellule nucleate e sulle piastrine dell'organismo e direttamente coinvolte nei fenomeni di rigetto in caso di trapianti. MHC-II, costituito da HLA-D, -DR, -DP e -DQ, è ampiamente distribuito sulle cellule immunocompetenti: cellule B, macrofagi e su tutte le APC. Mentre MHC I presenta antigeni endogeni, MHC II espone e presenta ai linfociti-TH antigeni esogeni. Il riconoscimento dell'antigene esposto dal MHC II da parte dei linfociti-TH, grazie alla presenza su queste cellule di recettori antigenici (TCR), costituisce un evento critico nella fase iniziale del processo infiammatorio. Negli ultimi decenni è stato investigato il possibile coinvolgimento dell'MHCII nei processi infiammatori che caratterizzano le patologie neurodegenerative, inclusa la malattia di Alzheimer. Attualmente i risultati riportati in letteratura sul possibile coinvolgimento di MHC II nei processi di neuroinfiammazione sono discordanti. E' stato dimostrato che anche le cellule di microglia esprimono MCH II (McGeer et al., 1987). Inoltre, studi condotti su tessuto cerebrale umano di soggetti colpiti dalla malattia di Alzheimer evidenziano la presenza di microglia attivata in prossimità delle placche amiloidi e che tali cellule gliali esprimono sulla loro superficie MCH II (McGeer et al., 1988). Tuttavia, contrariamente a quanto affermato da McGeer (1988), diversi gruppi di ricerca hanno riportato la presenza di MHC II anche su cellule di microglia non attivate (Gehrmann et al., 1993; Hayes et al., 1987). Appare quindi ancora da chiarire il ruolo di MHC II nella malattia di Alzheimer e nei meccanismi di neuroinfiammazione.

### 1.2.7. Stress Ossidativo

Con l'espressione "stress ossidativo" si identifica la modificazione del normale equilibrio intracellulare tra specie chimiche ossidanti, generalmente di natura radicalica e centrate sull'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS), prodotte fisiologicamente durante i processi metabolici, e il sistema di difesa antiossidante che svolge la funzione di neutralizzarle e/o di eliminarle dalla cellula stessa. Costituisce uno dei fattori di rischio emergenti per la salute. Ad esso, infatti, risultano associati non solo l'invecchiamento precoce, ma una serie di stati morbosi, spesso di natura degenerativa e ad andamento cronico. In particolare, il SNC rappresenta, per varie ragioni (elevato consumo di ossigeno, alti livelli di ferro, concentrazione significativa di acidi grassi polinsaturi, etc.) uno dei principali target dei ROS e, quindi, dello stress ossidativo, che viene oggi considerato uno dei principali cofattori di malattie neuro-

degenerative (malattia di Parkinson, malattia di Alzheimer, sclerosi laterale amiotrofica, etc.). Il danno cellulare inizia a livello della membrana con un'alterazione degli scambi tra interno ed esterno della cellula; all'interno viene alterata la formazione di ATP che è la fonte di energia della cellula, e si può arrivare fino all'alterazione del DNA.

L'ossido nitrico (NO) è un importante molecola regolatoria coinvolta nei meccanismi di difesa e ha un ruolo importante nei sistemi cardiovascolare, immune e nervoso. In condizioni patologiche, è mediatore del danno cellulare ossidativo e dei fenomeni neurodegenerativi. La sua produzione, a partire dal L-Arginina, è catalizzata da una famiglia di enzimi eucariotici, chiamati sintetasi dell'ossido nitrico (NOs). Sono riconoscibili tre diverse isoforme di questo enzima: neuronale (nNOs), endoteliale (eNOs) e inducibile (iNOs). Il NO gioca un ruolo anche nei meccanismi dell'infiammazione. Poiché la forma iNOs è presente anche nei fagociti (monociti, macrofagi e neutrofili), il NO (che ne viene sintetizzato) assume un ruolo importante in tutti i processi che caratterizzano la risposta immunitaria. La produzione del NO viene stimolata dall'IFN- $\gamma$ , che agisce singolarmente o in sinergismo con il TNF- $\alpha$  (Gorczyński and Stanely, 1999) *Clinical Immunology*). La fonte più abbondante di radicali liberi è la microglia attivata (Klegeris and McGeer, 2000). Il complesso della NADPH, presente nelle cellule di microglia, quando è assemblato e completamente attivato, genera un'alta dose di radicali che, liberati nel tessuto circostante, causano un danno. Vi è inoltre la generazione di NO da parte delle cellule di glia (Neuroinflammation Working Group, 2000).

Nel SNC, lo stress ossidativo esercita un importante ruolo nei processi di deterioramento cognitivo osservati nel AD. L'enzima iNOS genera NO e NO-derivati, specie reattive dell'azoto come il perossinitrito. L'accumulo di molecole altamente reattive induce perossidazione lipidica, nitrosilazione della tirosina, danno ossidativo al DNA, e impoverimento neuronale, che sono caratteristiche comuni del cervello AD (Butterfield et al., 2001). È interessante notare che questi eventi sembrano essere modulati da TNF- $\alpha$ . Inoltre, è stato dimostrato che A $\beta$  interagisce in modo sinergico con le citochine nell'indurre danno neuronale mediato dalle ROS e vie NO-dipendenti (Markesbery, 1997; Meda et al., 1995). Numerosi modelli animali sono stati utilizzati per valutare il ruolo dell'infiammazione nella AD. Un modello sperimentale di AD è stato sviluppato mediante l'iniezione intracerebroventricolare di A $\beta$  in topi (Van Dam and De Deyn, 2006). Utilizzando questo modello, è stato valutato il ruolo di TNF- $\alpha$  e iNOs nel deterioramento precoce dell'apprendimento e della memoria indotto da A $\beta$ . I dati ottenuti indicano che uno dei primi eventi indotti da A $\beta$ 1-40 è la produzione di TNF- $\alpha$ , che rappresenta un segnale importante

per l'espressione di iNOs. Studi *in vitro* indicano che i radicali liberi favoriscono il processo di aggregazione del peptide amiloide (Ancelin et al., 2007). D'altra parte, sembra che lo stesso peptide, interagendo con le cellule dell'endotelio vascolare, causi la perossidazione dei lipidi e la formazione di radicali liberi (Ancelin et al., 2007)

### 1.2.8. Interferone-gamma (IFN- $\gamma$ )

Gli interferoni (IFN) sono una classe di proteine prodotte dalle cellule del sistema immunitario e rilasciate in risposta all'attacco di agenti esterni come virus, batteri, parassiti e cellule tumorali. Sono delle glicoproteine appartenenti alla vasta classe delle citochine. Esistono due tipi e tre classi principali di IFN: IFN-alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e omega ( $\omega$ ), che sono IFN di Tipo I, e IFN-gamma ( $\gamma$ ) o di Tipo II. IFN- $\alpha$ , secreto principalmente dai leucociti, e IFN- $\beta$ , prodotto da varie cellule tra cui i fibroblasti, intervengono nella risposta immunitaria innata verso patogeni di origine virale. L'IFN- $\gamma$  è una potente molecola normalmente espressa da linfociti natural killer, linfociti T, cellule gliali e neuroni; sembra avere scarsa rilevanza nel mediare le risposte ai virus, mentre è il principale attivatore dei macrofagi, sia nel corso delle reazioni immunitarie innate, che in quelle cellule-mediate. Mostra un gran numero di funzioni immunomodulanti all'interno del sistema nervoso centrale, comprese l'attivazione dei macrofagi/microglia (Aloisi, 2001) e la stimolazione delle cellule microgliali a rilasciare radicali liberi dell'ossigeno (Blasko et al., 2001) e potenzia l'espressione di chemochine e molecole di adesione cellulare richieste per la migrazione delle cellule T al cervello (Tran et al., 2000). Tuttavia, al di là del suo ruolo primario nel processo infiammatorio, risultati recenti dimostrano che l'espressione di IFN- $\gamma$  è aumentata nel cervello di individui anziani (Frank et al., 2005; Saurwein et al., 2000; Maes et al., 1999). Inoltre, IFN- $\gamma$  aumenta la permeabilità vascolare ai linfociti T e natural killer e promuove l'espressione di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nella microglia (Marx F et al., 1999), il che suggerisce un ruolo chiave di questa citochina nella elaborazione di risposte immunitarie e infiammatorie nel SNC coinvolte nei meccanismi di neurodegenerazione. Studi condotti su tessuto umano evidenziano alterazioni nell'espressione di IFN- $\gamma$  correlata ai processi neurodegenerativi associati alla malattia di Alzheimer (Blasko et al., 2000). È stata dimostrata una correlazione tra IFN- $\gamma$  e l'induzione di entrambi i peptidi  $\beta$  amiloidi, A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42 (Blasko et al., 2000). Studi *in vitro* documentano che l'IFN- $\gamma$  causa un aumento della produzione e del rilascio di TNF- $\alpha$  da parte delle cellule di microglia stimulate con il peptide A $\beta$ , indicando un effetto sinergico tra IFN- $\gamma$  e peptide  $\beta$ -amiloide (Meda et al., 1995). A supporto di un ruolo dell'IFN- $\gamma$  nella malattia di Alzheimer, in

modelli murini transgenici di AD è stato dimostrato che, nella fase precedente alla deposizione di placche amiloidi (3 mesi di età), si verifica un progressivo aumento di questa citochina in funzione dell'età (Abbas et al., 2002). Inoltre, ancora in un modello murino di AD, è stato confermato il sinergismo tra IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , la cui coespressione determina un'augmentata produzione di A $\beta$  e una ridotta clearance del peptide (Yamamoto et al., 2007).

### 1.2.9 Strategie terapeutiche

Molte e differenziate forme di intervento vengono messe in atto nella gestione dei pazienti affetti da malattia di Alzheimer nel tentativo di contrastare la progressione del morbo e di alleviare la sintomatologia. La terapia farmacologica è affiancata da forme di trattamento non-farmacologico. Queste ultime consistono prevalentemente in misure comportamentali, di supporto psicosociale e di training cognitivo, anche con l'impiego di strumenti atti a rievocare i ricordi e stimolare la memoria del paziente (come, ad es., il "film della vita", un filmato riassuntivo di 30-60 minuti con immagini tratte dagli album di famiglia e filmini girati negli anni precedenti, accompagnato da musiche che hanno scandito i periodi importanti della vita del paziente). Tuttavia, grande importanza rivestono le strategie terapeutiche farmacologiche, grazie alle quali si spera di poter riuscire a modulare farmacologicamente i meccanismi patologici che stanno alla base della malattia e quindi a poterla gestire clinicamente.

Molte delle attuali terapie cliniche sono principalmente dirette a correggere disfunzioni di specifici sistemi neurotrasmettitoriali. Poiché nella malattia di Alzheimer si verifica una riduzione dei livelli di acetilcolina nella corteccia cerebrale (Davies P, Maloney AJ, 1976; Whitehouse PJ, 1982), la terapia attualmente più utilizzata si basa sull'impiego di farmaci che tendono a ripristinare i livelli fisiologici di acetilcolina, inibendo le colinesterasi responsabili del catabolismo della molecola e determinando un aumento dei livelli del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico. Tuttavia, nei soggetti affetti dalla malattia di Alzheimer la degenerazione dei neuroni corticali sembra essere correlata anche ad aumentati livelli di glutammato (Francis, 2003). Questo determina l'instaurarsi di un effetto eccitotossico con un continuo flusso di calcio intracellulare, responsabile della morte delle cellule. Tali considerazioni hanno portato, più recentemente, all'utilizzo di farmaci che agiscono direttamente sul sistema glutamatergico, come antagonisti dei recettori NMDA, limitando l'effetto del glutammato sulle cellule. Inoltre, un ulteriore approccio terapeutico alla patologia è rappresentato dal controllo della componente infiammatoria con l'impiego di farmaci anti-infiammatori non steroidei. Questo approccio terapeutico è stato individuato a seguito di osservazioni condotte su pazienti affetti da artrite e sotto trattamento cronico con ibuprofene, tra i quali l'incidenza

della patologia risultava più bassa rispetto al resto della popolazione (McGeer and McGeer, 2006). E' stata messa in evidenza anche l'azione protettiva della vitamina E (alfa-tocoferolo), che sembra prevenire la perossidazione lipidica delle membrane neuronali causata dal processo infiammatorio (McGeer and McGeer, 2006). Attualmente, purtroppo, nessuno degli strumenti farmacologici usati sulla base di queste evidenze si è rivelato efficace nel prevenire e/o arrestare il devastante processo neurodegenerativo che caratterizza la patologia.

Poiché restano ancora assai frammentarie le conoscenze sui meccanismi che rendono particolarmente vulnerabili le aree cerebrali e i neuroni colpiti dalla patologia (in particolare quelli coinvolti nelle funzioni e nei processi mnemonici) e che attualmente nessuno degli approcci farmacologici in uso si è rivelato in grado di rallentare o impedire il drammatico decorso della patologia, si rende a tutt'oggi indispensabile l'identificazione di nuovi target su cui mirare nuove strategie terapeutiche e lo sviluppo di ulteriori strumenti, in particolare modelli animali della malattia, attraverso i quali raggiungere una migliore comprensione della patogenesi e l'individuazione di nuovi trattamenti sperimentali. La condizione ideale sarebbe la riproduzione della patologia nella scimmie, data la vicinanza con la specie umana, che però richiede costi molto elevati [interessante, a questo proposito, è la notizia che nei primati è possibile reperire le caratteristiche anatomo-patologiche della malattia di Alzheimer (Rosen et al., 2008)]. Sono stati invece sviluppati diversi modelli animali transgenici murini di AD (vedi Tabella 1). Tuttavia, nessuno di questi riproduce tutte le alterazioni osservate nella patologia, ma solo alcune delle sue caratteristiche, fornendo quindi una rappresentazione incompleta della stessa. La maggior parte dei modelli animali transgenici di AD sono prodotti con inserimento di uno o più geni mutati associati alla forma familiare di AD, che inducono la sovraespressione di peptide A $\beta$ . Attualmente le tre mutazioni geniche descritte nelle forme familiari sono: APP, PS1 e PS2 (Hutton and Hardy 1997; Cruts and Van Broeckhoven 1998; Rocchi et al. 2003; Bertoli-Avella et al. 2004; Pastore e Goate 2004). Come si può osservare dalla Tabella 1, i vari modelli animali riproducono lesioni anatomo-patologiche simili a quelle riscontrate nell'AD, con sovraespressione di APP e accumulo di A $\beta$  in depositi simili alle placche senili. I tempi di comparsa di queste ultime variano a seconda del modello considerato. In alcuni modelli si evidenziano depositi amiloidi e formazione di placche a livello dell'ippocampo e della corteccia già dai primi tre mesi (Rockenstein et al., 2001), in altri modelli queste lesioni si manifestano intorno ai 6-9 mesi (Andra et al., 1996; Oddo et al., 2003).

Mentre sono stati creati diversi modelli transgenici nel topo, i modelli transgenici di ratto sinora prodotti sono stati pochi e non si sono rivelati in grado di riprodurre la piena patologia. Recentemente nel

laboratorio di Dr A. Claudio Cuello (McGill University, Montreal, Canada) è stata generata una nuova linea di ratti transgenici, denominata McGill-R-Thy1-APP. Questi ratti esprimono la proteina umana precursore del peptide  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ PP) caratterizzata dalla presenza delle mutazioni *Swedish* e *Indiana*, determinanti per la formazione di A $\beta$  (Leon et al., 2010). Questa nuova linea di ratti transgenici mostra una prolungata fase di accumulo di A $\beta$  intraneuronale, visibile già ad una settimana dopo la nascita, che è diffusa in diverse aree corticali incluso l'ippocampo (CA1, CA2, CA3 e giro dentato). Negli animali omozigoti, all'età di 6 mesi sono visibili densi depositi di A $\beta$  extracellulare positivi alla tioflavina S, associati ad attivazione gliale e neuriti distrofiche. Le funzioni cognitive e memoniche nei ratti transgenici McGill-R-Thy1-APP, valutate con il test Morris Water Maze, sono alterate già dai tre mesi d'età, quando non sono ancora presenti le placche amiloidi. La compromissione cognitiva spaziale diventa grave negli animali più vecchi (13 mesi), in cui le ridotte performance cognitivo-comportamentali correlano con i livelli corticali di A $\beta$  (Leon et al., 2010).

Tab.1 Tabella riassuntiva dei più rappresentativi modelli murinici per la malattia di Alzheimer.

Tab 1. Alcuni dei più rappresentativi modelli murinici di AD

Modello	Mutazione genetica	Specie	Strategia	Fenotipo	Referenze
PDAPP tg	hAPP695, 751, 770 V717F (Ind)	Topo	Overespressione di APP	Depositi amiloidi (3 mesi) e placche mature nella formazione dell'ippocampo e nella neocorteccia	Rockenstein et al. 2001.
Thy1-APP751 Swe/Ind tg	hAPP751 Mouse  K670N/M671 (Swe) V717F	Topo	Overespressione di APP	Depositi amiloidi (6 mesi), gliosi e tau iperfosforillata	Andra et al. 1996
3xTg-	AD hAPP695 K670N/M671 (Swe) hTau4R0N P301L	Topo	Knockin PS1 Overespressione di APP	Depositi amiloidi intraneurali (9 mesi)- deficit cognitivi	Oddo et al. 2003
Rat PDGFb- tg hAPP751	APP751  K670N/M671 (Swe) V717F	Ratto	Overespressione di APP	Depositi intracellulari di proteina amiloide	Echeverria et al. 2004

---

Crews et al. Brain Struct Funct (2010) 214:111–126.

## 2.RAZIONALE DEL PROGETTO E SCOPO DELLA RICERCA

Sembra ormai chiaro che la componente flogistica rivesta un ruolo decisivo nella progressione della malattia di Alzheimer. Tuttavia, nonostante il crescente interesse della comunità scientifica per questo aspetto, resta ancora da chiarire se il processo infiammatorio rappresenti una fase preliminare, con comparsa antecedente alla formazione di aggregati amiloidi, o un evento secondario della patologia. Inoltre, se i processi infiammatori fossero effettivamente alla base della malattia, monitorare la loro comparsa ed evoluzione potrebbe rappresentare uno strumento strategicamente importante per prevenire lo svilupparsi della malattia, d'altra parte, contrastarne il progresso potrebbe essere il mezzo per rallentare o impedire l'insorgenza del morbo. Partendo da questo presupposto, appare di grande interesse analizzare se e come molecole coinvolte nei processi di flogosi e di attivazione della microglia varino nei soggetti malati a confronto con gli individui sani e, in particolare, valutare come esse si comportino in stadi prodromici della malattia, con la speranza di poter individuare variazioni indicatrici della presenza di un processo infiammatorio nel tessuto umano che rappresentino spie di un processo patologico in evoluzione.

Nel mio lavoro, ho raccolto dati relativi a molecole implicate nei processi infiammatori e mi sono avvalsa dell'uso di tessuti provenienti da due fonti particolari: da un lato una banca di cervelli umani di soggetti volontari sani e malati, e, dall'altro, dall'allevamento di un particolare ceppo di ratti transgenici che esprimono le caratteristiche della patologia di Alzheimer (Leon et al., 2010). La banca dei cervelli da cui proviene il materiale umano ha sede presso il Rush University Medical Center, che, grazie al programma definito Religious Orders Study, raccoglie oltre un migliaio di casi da soggetti appartenenti a diversi ordini religiosi (suore, sacerdoti e frati). Ogni soggetto ha accettato di sottoporsi in vita ad un monitoraggio annuale di valutazione medica e psicologica e, alla sua morte, di donare il cervello alla banca del Centro. Pertanto, ogni campione è accompagnato da una storia clinica documentata e da una precisa diagnosi. La disponibilità dell'analisi medica periodica consente di seguire e valutare l'eventuale passaggio, nei singoli individui, dal normale funzionamento cerebrale alla comparsa di sintomi di compromissione cognitiva, che possono essere segno precoce di malattia, sino alla malattia conclamata. Tre distinte popolazioni sono state oggetto di studio: (1) la popolazione di controllo senza nessun apparente deficit cognitivo e con capacità mentali integre, definita dall'espressione *No Cognitive Impairment* (NCI), (2) la popolazione caratterizzata da un lieve ritardo cognitivo, che rappresenta la fase pre-clinica, chiamata

*Mild Cognitive Impairment (MCI)*, e (3) la popolazione con una sintomatologia conclamata, ovvero *Alzheimer Disease (AD)*.

Traendo vantaggio dalla possibilità di analizzare tessuto cerebrale umano in queste tre gruppi d'indagine, ho focalizzato le mie osservazioni sulla implicazione di diversi mediatori responsabili di alcuni eventi che caratterizzano il processo infiammatorio come: attivazione gliale, stress ossidativo e maturazione ed espressione di citochine proinfiammatorie. Il coinvolgimento delle cellule di glia, e in particolare della microglia coinvolta nei meccanismi di difesa del SNC, è stata valutata attraverso l'espressione di due proteine di membrana, CD40 e MHC II, la cui sovra-espressione denota una condizione di attivazione cellulare a seguito di un insulto. La presenza di un eventuale danno da stress ossidativo è stato valutato attraverso un'indagine indiretta rivolta all'individuazione di alterati livelli dell'enzima NOs, nella sua forma inducibile, coinvolto nella formazione di ossido nitrico implicato nei processi di danno neuronale. In ultima istanza, la componente pro infiammatoria, citochine, è stata valutata analizzando la presenza di MMP-9, proteina coinvolta nei processi di maturazione delle citochine e responsabile della alterata espressione di alcuni fattori neurotrofici nella malattia di Alzheimer, e dall' IFN- $\gamma$ , uno dei primi mediatori rilasciati nel processo di flogosi. L'analisi di queste componenti ha lo scopo di:

1. verificare in aree cerebrali particolarmente vulnerabili alla malattia, come la circonvoluzione temporale inferiore e la circonvoluzione frontale media implicate nei processi di memoria a lungo termine e di memoria associativa, l'espressione e la variazione di diversi marker e valutare la possibile correlazione con la condizione patologica accertata in vita.
2. valutare se in alcuni soggetti della popolazione di controllo sia presente un'alterata espressione dei marker in esame che sia segnale di una condizione che progredisce verso la patologia. Tale requisito consentirebbe quindi l'individuazione di un biomarker che possa rappresentare un valido strumento per la diagnosi precoce.

Parallelamente allo studio condotto sul tessuto umano, ho deciso di studiare alcuni aspetti del processo flogistico sia su ratti wild type che in un modello murino di AD, utilizzando il liquido cerebrospinale come campione di studio. La facile reperibilità del CSF e la non invasività della chirurgia impiegata per la sua raccolta lo rendono uno strumento ideale e consente di effettuare ripetute indagini in tempi diversi, anche sullo stesso animale, permettendo uno studio a lungo termine della patologia in questo modello sperimentale di AD.

I ratti transgenici, indicati con la sigla McGill-R-Thy1-APP, utilizzati per questi esperimenti sono stati creati presso il Laboratorio del Prof. A.Claudio Cuello alla McGill University, Montreal. In questi ratti, è stato inserito un singolo transgene che codifica una variante modificata dell'isoforma 751 della proteina umana A $\beta$ PP (A $\beta$ PP<sub>751</sub>), contenente le mutazioni *Swedish* e *Indiana*, la cui espressione determina la formazione di placche amiloidi circondate da neuriti distrofiche e microglia reattiva, e la comparsa di deficit cognitivi, riproducendo quindi una patologia con molte delle caratteristiche patognomiche della demenza di Alzheimer (Leon et al., 2010).

In questo progetto ho voluto verificare:

1. La possibilità di utilizzare il liquido cerebrospinale come fonte di biomarker, nel caso specifico MMP-9, utilizzabili per un eventuale indagine diagnostica
2. valutare nel CSF le variazioni dell'attività dell'MMP-9 a seguito del processo flogistico A $\beta$  mediato
3. verificare la presenza di un'alterata attività gelatinolitica, MMP-9 specifica, nel CSF e in sezioni di ippocampo di ratti transgenici nelle fasi precedenti la deposizione di placche amiloidi.

## 3.MATERIALI E METODI

### 3.1.CAMPIONI

#### 3.1.1.Campioni umano

La popolazione campione analizzata in questo progetto è costituita da 37 soggetti NCI, 11 MCI e 11 AD, per un totale di 59 casi. Per ogni soggetto sono pervenuti campioni di circa 250 mg da tre diverse aree cerebrali: circonvoluzione frontale media, circonvoluzione temporale inferiore e cervelletto. I casi clinici considerati erano tutti individui appartenenti al clero cattolico (preti, suore, frati), che in vita decisero volontariamente di partecipare ad uno studio clinicopatologico longitudinale tra età e demenza di Alzheimer. Tale studio prende il nome di Religious Orders Study (ROS), ed è approvato dal Review Board of Rush University Medical Center. Per ogni soggetto viene stilata una valutazione clinica che include un'anamnesi medica, la sottomissione periodica ad esami neurologici e test di capacità neuropsicologiche. Sulla base dei risultati ottenuti e in accordo con i parametri proposti dal NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) Work Group (McKhann et al., 1984), i partecipanti sono classificati in NCI, MCI e AD. Ciascun partecipante accede a questo programma firmando un consenso informato e una autorizzazione alla donazione postmortem del tessuto cerebrale per scopi di ricerca. Alla morte si è proceduto all'estrazione del cervello, al suo sezionamento e al successivo congelamento.

#### 3.1.2.Campioni di ratto

##### Ratti transgenici McGill-R-Thy1-APP

I ratti transgenici McGill-R-Thy1-APP sono stati generati con una tecnica di iniezione pronucleare standard (Gordon et al., 1980) utilizzando ratti Wistar HsdBrl:WH. Il costrutto di DNA usato era costituito dagli elementi regolatori 5' e 3' del promotore dell'antigene timocitario murino (Thy1.2) (Van der Putte et al., 2000; Luthi et al., 1997), che portano il cDNA per il gene A $\beta$ pp751 (hA $\beta$ pp) umano contenente l'intera regione codificante e circa 900 bp della sequenza 3' non translata, che contiene al suo interno la doppia mutazione *Swedish* [K670N, M671L, (Mullan et al, 1992)] e la mutazione *Indiana* [V717F, (Murrell

et al., 1991)]. La presenza del transgene viene valutata in tutti gli animali (genotipizzazione con amplificazione per PCR del DNA estratto dalla coda).

Ratti Fischer-344. Sono stati usati ratti maschi di 4 mesi di età del peso di 300-350 g. Tutti gli animali, Fisher e transgenici, sono stati stabulati in numero di 4 per gabbia, alla temperatura di 24°C, umidità al 60%, luce accesa dalle 7:00 alle 19:00 con acqua e cibo ad libitum.

## **3.2.METODI**

### **3.2.1.Western Blot**

Il tessuto congelato è stato processato per l'estrazione delle proteine con un buffer di omogenizzazione (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NonidexP-40, 0,1% SDS, 0,1% deoxycholic acid, 2 µg/ml of aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 100 µg/ml PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride), pH 7.4). Il tessuto incubato in questa soluzione per 15 minuti in ghiaccio, è stato sonicato e centrifugato a 14000 g per 45-60 minuti a 4°C. Le proteine contenute nel surnatante sono state quantificate usando un kit per l'analisi proteica (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Per ciascun campione, 100 µg di proteine sono stati addizionati al loading buffer (75 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glicerolo, 5% 2-β-mercaptoetanol, 0,001 ml di Blu di Bromofenolo) e portati alla temperatura di 100°C per circa 3 minuti. I campioni sono stati fatti correre su un gel di poliacrilamide a concentrazione variabile da 8 a 12%, in base al peso molecolare della proteina da analizzare. Le proteine separate sono state poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante blotting in campo elettrico. La membrana è stata bloccata in TBS-T (Tris Buffer-10 % Tween-20) con il 5% di polvere di latte senza grassi (Carnation) per 1 h a temperatura ambiente. Si è proceduto all'incubazione della membrana con l'anticorpo primario, per tutta la notte in camera fredda (4°C), e poi con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi, per un ora a temperatura ambiente. Per la rilevazione della immunoreazione è stato usato il sistema chemiluminescente ECL (Amersham-Pharmacia) seguendo il protocollo fornito dall'azienda. La banda immunoreattiva è stata determinata tramite densitometria del film usando il sistema di analisi d'immagine MCID. Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati con la β-actina.

Sono stati usati i seguenti anticorpi:

Rabbit Anti-MMP-9 (Chemicon, Millipore) usato alla diluizione di 1:500, Rabbit Anti-CD40 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) usato alla diluizione di 1:1000, Mouse Anti-iNOs (Abcam) usato alla diluizione di 1:500, Rabbit Anti-MHCII (DAKO) diluito 1:1000 e Mouse Anti- β-actina, diluito 1:50000. Anticorpi

secondari: Goat Anti Rabbit (Sigma) diluito 1:5000 e Goat Anti Mouse, diluito 1:5000 per iNOs e 1:10000 per  $\beta$ -actina.

### 3.2.2.Zimografia

Il tessuto congelato è stato sonicato e omogenato con un Buffer privo di qualsiasi chelante che possa inattivare le metalloproteasi. Per la valutazione delle MMP-9 presenti, il campione, 70  $\mu$ g di proteine per il tessuto omogenato e 25  $\mu$ l per il CSF, è stato sottoposto a SDS-PAGE in condizioni non denaturanti (gel in poliacrilamide al 10% con l'aggiunta di gelatina allo 0,3% per l'omogenato di tessuto e allo 0,1% per il CSF, substrato specifico per le MMP-9, senza l'uso del  $\beta$ -mercaptoetanolo e senza bollitura per il pretrattamento del campione). Il gel è stato incubato con un tampone di rinaturazione (Triton X-100 25% (v/v) in acqua), in costante agitazione per 30 min a temperatura ambiente e poi in un Buffer di Sviluppo (50mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,02% Brij35, pH7.6), a 37°C, per 24h nel caso dell'omogenato e 40h per il CSF. Per rivelare la presenza delle bande di attività gelatinolitica il gel è stato incubato con una soluzione di Comassie Blue R-250 allo 0,5% disciolto in etanolo al 40%, per 30 minuti a temperatura ambiente. Di conseguenza, le zone di localizzazione dell'attività proteasica appaiono come bande chiare su uno sfondo blu. L'eccesso di colorante è stato eliminato con una soluzione di lavaggio (Destaining Solution) costituita da metanolo:acido acetico:acqua (40:10:50).

### 3.2.3.ELISA

Il test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) è stato usato per quantificare la concentrazione di IFN- $\gamma$  nell'omogenato di tessuto cerebrale. E' stato usato un kit commerciale (R&D Systems, Minneapolis, MN) seguendo il protocollo fornito dall'azienda.

### 3.2.4. Iniezioni bilaterali di A $\beta$ nell'ippocampo

Ratti maschi Fischer-344, dell'età di quattro mesi, sono stati divisi in quattro gruppi sperimentali: il primo gruppo (n = 4) ha ricevuto bilateralmente nell'ippocampo un 1  $\mu$ g di oligomeri di A $\beta$ , il secondo gruppo (n = 4) ha ricevuto bilateralmente 1  $\mu$ g del peptide di controllo A $\beta$ 42-1, il terzo gruppo (n=4) ha ricevuto bilateralmente 1 $\mu$ g di lipopolissacaride (LPS) e il quarto gruppo (n=4) ha ricevuto il solo veicolo (soluzione fisiologica). Ogni animale è stato anestetizzato con idrato di cloralio ( 400mg/Kg), posizionato nell'apparato stereotassico (Davis Kopf Instruments, Tujunga, CA) e ha ricevuto un'unica iniezione del volume di 3  $\mu$ l, con l' utilizzo di una pompa a siringa Hamilton. Le coordinate stereotassiche del target erano: antero-posteriore - 4,5 mm; laterale  $\pm$  3,5 mm; verticale – 3,5 mm, riferite al bregma preso come zero (Paxinos and Watson, 1982). L'iniezione è stata eseguita in un tempo di 1-2 minuti. Gli animali sono stati tenuti in vita per 72 h e poi sacrificati.

### 3.2.5. Preparazione degli oligomeri di A $\beta$

Oligomeri solubili di A $\beta$  sono stati preparati sciogliendo 1,0 mg del peptide A $\beta$  in 400  $\mu$ l di esafluoroisopropanolo a temperatura ambiente. A 100  $\mu$ l di questa soluzione sono stati aggiunti 900  $\mu$ l di acqua bidistillata. La soluzione risultante è stata centrifugata per 15 min a 14.000 g. La frazione supernatante è stata trasferita in una nuova provetta e sottoposta a un delicato flusso di N<sub>2</sub> per 5-10 min, sino all'evaporazione dell'esafluoroisopropanolo. Infine, la soluzione contenente il peptide è stata agitata a 500 giri/min utilizzando un Microstir per 24-48 h a 22 °C. La stessa procedura è stata seguita per preparare la soluzione contenente il peptide di controllo (A $\beta$  42-1, reverse peptide) (Demuro et al., 2005).

### 3.2.6. Raccolta del liquido cerebrospinale (CSF)

Per la raccolta del CSF ho utilizzato dei capillari di vetro (The Sutter Instrument Inc.- Borosilicate glass, B100-75-10), tirati mediante un Laser Puller alla temperatura di 300°C e alla pressione di 330 atm.. Prima dell'utilizzo, la punta del capillare di vetro è stata recisa con delle forbici in modo da ottenere una punta conica con un diametro di circa 0,5 mm. Il CSF è stato prelevato dalla cisterna magna. Ciascun ratto, anestetizzato con idrato di cloralio (400 mg/Kg), è stato posizionato prono sullo stereotassico in

modo che la testa formasse con il corpo un angolo di 135°. Il sito chirurgico è stato tamponato con iodio povidone al 10%, e etanolo al 70%. Incisa la cute nella zona atlanto–occipitale, la dissezione del tessuto sottocutaneo e muscolare ha consentito un facile accesso alla cisterna magna, che appare come un piccolo triangolo lattiginoso. Con la punta del capillare il rivestimento meningeo è stato forato e una quantità di almeno 100 µl di CSF è stata raccolta per capillarità, trasferita in una provetta e immediatamente congelato a – 80°C fino all'uso. Dopo il campionamento del CSF, la ferita è stata suturata.

Il CSF è stato prelevato da ratti transgenici non trattati e da ratti Fisher trattati con iniezioni intraippocampali di peptide A $\beta$  e relativi controlli.

### 3.2.7. Zimografia in situ e Immunoistochimica

In questa procedura sperimentale sono stati utilizzati ratti transgenici McGill-R-Thy1-APP omozigoti (n = 3), eterozigoti (n = 3) e ratti maschi di quattro mesi wild-type appartenenti alla stessa colonia (n = 3). Gli animali sono stati anestetizzati con idrato di cloralio (400mg/Kg) e sacrificati per decapitazione. Il cervello è stato rimosso rapidamente e congelato in isopentano e conservato a -80°C fino all'uso. Successivamente, il cervello è stato tagliato al criostato, ricavando sezioni coronali dell'ippocampo dello spessore di 8µm, che sono state raccolte su vetrini portaoggetto. La localizzazione dell'attività gelatinolitica è stata valutata con l'impiego della zimografia in situ. Le sezioni sono state essiccate per 10 minuti a temperatura ambiente e lavate in soluzione fisiologica tamponata con tampone fosfato (PBS) (tre x 5 min) per rimuovere le tracce di OCT. Le sezioni sono state incubate con un substrato per le MMP costituito da gelatina fluorogenica (DQ gelatin, Invitrogen), che a seguito dell'attività proteolitica emette un segnale fluorescente verde. Il substrato è stato preparato sciogliendo 1mg di gelatina QD in 1 ml di acqua Milli-Q (Millipore Corporation). Questa soluzione è stato ulteriormente diluita 1:50 in un tampone di reazione contenente 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> e 0,2 mM sodio azide, pH 7,6. Le sezioni sono state incubate con 250 µl di questa soluzione finale, coperte con del parafilm e tenute in camera umida al buio a 37°C (Sbai et al., 2008; Miller et al., 2005). Al termine dell'incubazione il parafilm è stato rimosso delicatamente, le sezioni sono state sciacquate con acqua Milli-Q e fissate in paraformaldeide 4% per 10 min al buio. Le sezioni sono state poi incubate con un anticorpo primario anti-MMP-9 (Santa Cruz), diluito 1:100 in PBS in camera umida per tutta la notte. Al termine dell'incubazione, le sezioni sono state lavate in PBS (tre x 5 min) e incubate con l'anticorpo secondario

Alexa Fluor 458 per 1h a temperatura ambiente. Al termine della seconda incubazione le sezioni sono state montate con un medium fluido contenente glicerolo. Le immagini dei preparati sono state acquisite con un microscopio Axioplan 2 Imaging dotato di una fotocamera digitale AxioCam HRc (Zeiss Canada, Toronto, ON).

### 3.2.8 . Analisi statistica dei dati

Il confronto tra le popolazioni di campioni umani è stato effettuato utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA). Dal momento che NCI era la popolazione più grande e diversificata per età, ho deciso di smembrare il gruppo in 3 diverse sottopopolazioni identificate per fasce d'età: NCI70, soggetti di età da 65 a 78 anni, NCI80, soggetti di età da 79 a 88 anni e NCI90, soggetti di età da 89 a 101 anni. In casi di particolare interesse, ho effettuato un'ulteriore analisi confrontando MCI e AD con le tre popolazioni NCI. L'analisi statistica dei dati ottenuti sul CSF ratto è stata effettuata mediante two way ANOVA.

## 4. RISULTATI

### 4.1. CERVELLO UMANO

#### 4.1.1. MMP-9

I livelli proteici del MMP-9 sono stati misurati con il western blot, mentre l'attività enzimatica è stata esaminata con l'impiego della zimografia.

##### Circonvoluzione, frontale media

L'analisi western blot (Fig. 6 A,B,C) condotta sulla circonvoluzione frontale media ha rivelato livelli di MMP-9 simili per le tre popolazioni campione (NCI, MCI e AD). Come si può evincere dalla rappresentazione grafica (Fig.6 B,C), i livelli proteici ottenuti si mantengono bassi (livello medio: NCI = 0,20, MCI = 0,18 e AD = 0,11) e il confronto tra i gruppi non evidenzia nessuna significatività statistica ( $p > 0,005$ ). E' interessante notare che nei gruppi MCI e AD i livelli si distribuiscono in modo omogeneo intorno al valore medio. Invece, nella popolazione NCI è possibile osservare che una sub-popolazione si discosta lievemente dalla media, mostrando livelli più alti. Scomponendo il gruppo per fasce di età (Fig. 6 C), si osserva che nei gruppi NCI80 e NCI90 i livelli di MMP-9 appaiono superiori a quelli del gruppo NCI170, il che suggerisce la possibilità di un aumento dell'espressione di MMP-9 con l'età.

La valutazione dell'attività gelatinolitica condotta sull'omogenato di tessuto della stessa area (Fig. 7 A, B), rivela una situazione più varia. Le tre popolazioni non sono omogenee ma caratterizzate da valori distribuiti in modo casuale intorno al valore medio (NCI = 2,79; MCI = 2,92 e AD = 2,92). Il confronto dei tre gruppi evidenzia livelli di attività enzimatica più elevati nella popolazione MCI rispetto a quelle NCI e AD, nonostante queste variazioni non siano statisticamente significative.

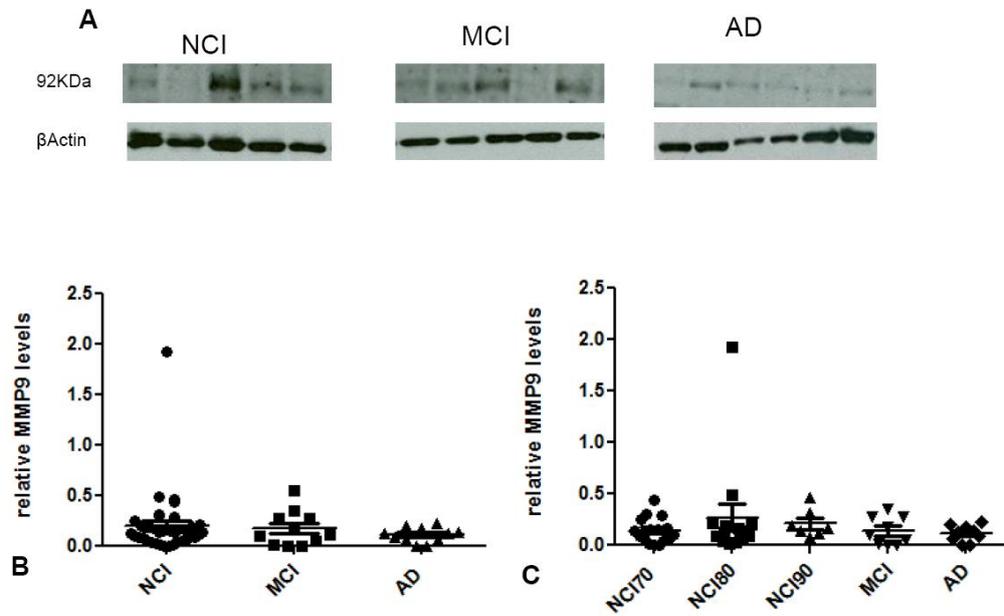


Fig.6 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di MMP-9 nella circonvoluzione frontale media. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

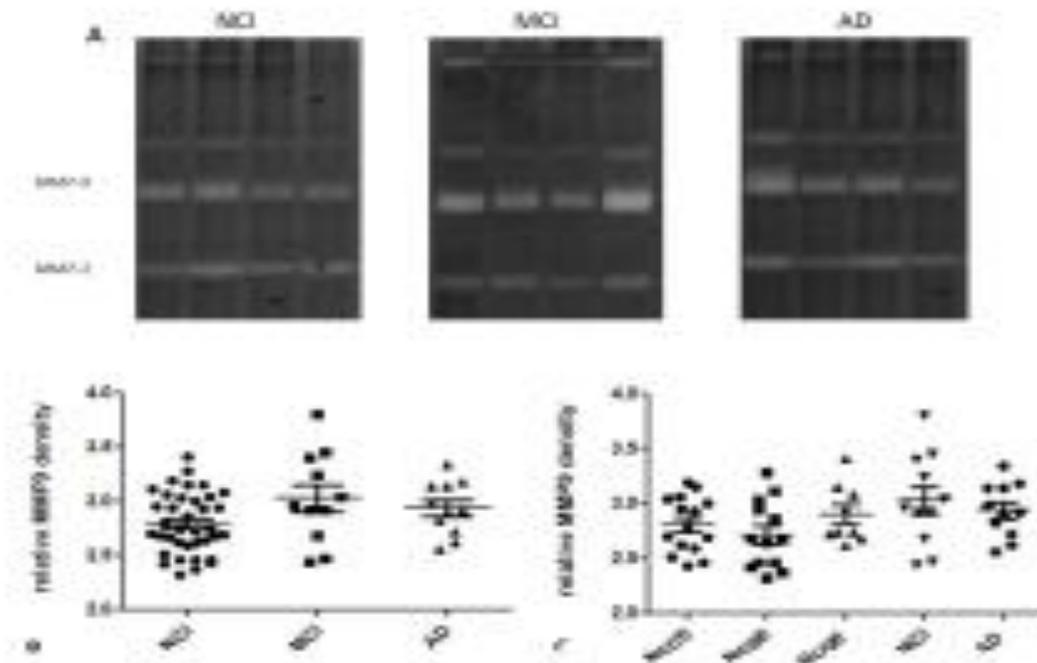


Fig.7 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati con la zimografia per valutare l'attività gelatinolitica nella circonvoluzione frontale media. B: Livelli relativi di attività della MMP-9 nei tre gruppi considerati. C: Analisi condotta per fasce di età.

## Circonvoluzione temporale inferiore

L'analisi Western Blot degli omogenati di circonvoluzione della circonvoluzione temporale inferiore (Fig. 8 A,B,C) mostra che nelle popolazioni NCI e MCI i livelli di MMP-9 sono distribuiti piuttosto omogeneamente intorno al valore medio, pari a 0,65 per NCI e 0,55 per MCI (Fig.8 B,C), e tra i due gruppi non esistono differenze statisticamente significative. Invece, nella popolazione AD i valori si distribuiscono in modo più differenziato attorno al valore medio di 0,68 (Fig. 8 B,C). Inoltre, quest'ultimo è circa il doppio dei precedenti e questa differenza è statisticamente significativa. Risultati simili sono stati ottenuti con la zimografia (Fig. 9 D,E): mentre le popolazioni NCI e MCI esprimono livelli simili di attività enzimatica e appaiono compatte ed omogenee intorno al valore medio di 1,18 per NCI e 1,24 per MCI, la popolazione AD mostra un aumento dell'attività enzimatica, con livelli quasi doppi, 1,92, rispetto alle altre due popolazioni. Quindi, la zimografia conferma i risultati del western blot, indicando un incremento statisticamente significativo ( $p < 0,005$ ) dell'espressione di metalloproteasi nel gruppo AD rispetto a NCI e MCI.

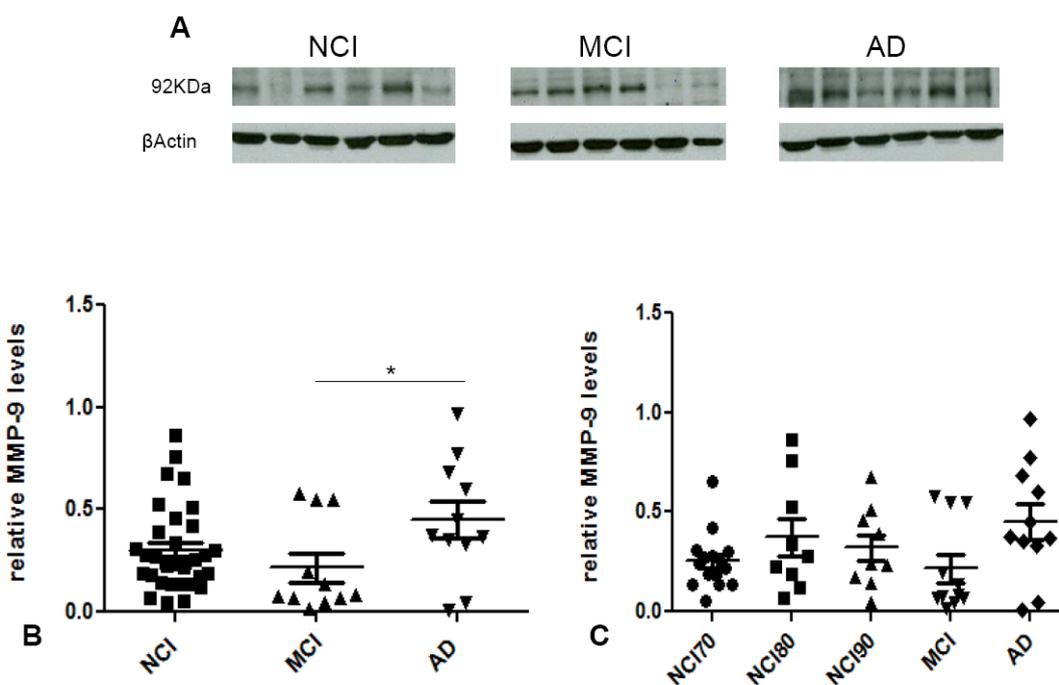


Fig.8 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di MMP-9 nella circonvoluzione temporale inferiore. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

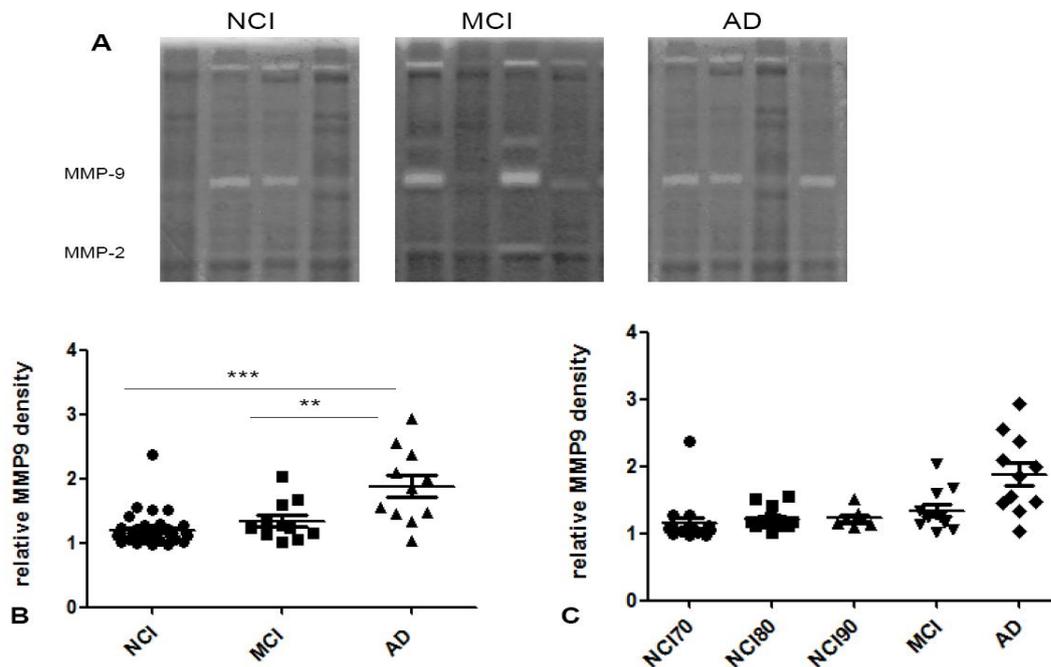


Fig.9 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati con la zimografia per valutare l'attività gelatinolitica nella circonvoluzione temporale inferiore. B: Livelli relativi di attività della MMP-9 nei tre gruppi considerati. C: Analisi condotta per fasce di età.

#### Cervelletto

Le analisi western blot (Fig. 10 A, B) e per zimografia (Fig. 11 C, D) su omogenato di cervelletto, hanno prodotto risultati simili a quelli ottenuti nella circonvoluzione frontale: i livelli proteici espressi si mantengono bassi e omogenei per le tre popolazioni (NCI = 0,07, MCI = 0,06 e AD = 0,05), e dal loro confronto non si evincono variazioni di significatività statistica. Con la zimografia (Fig. 11 C, D), tutti i gruppi sono caratterizzati da una certa eterogeneità dei valori, ma, ancora, non si riscontrano differenze statisticamente significative.

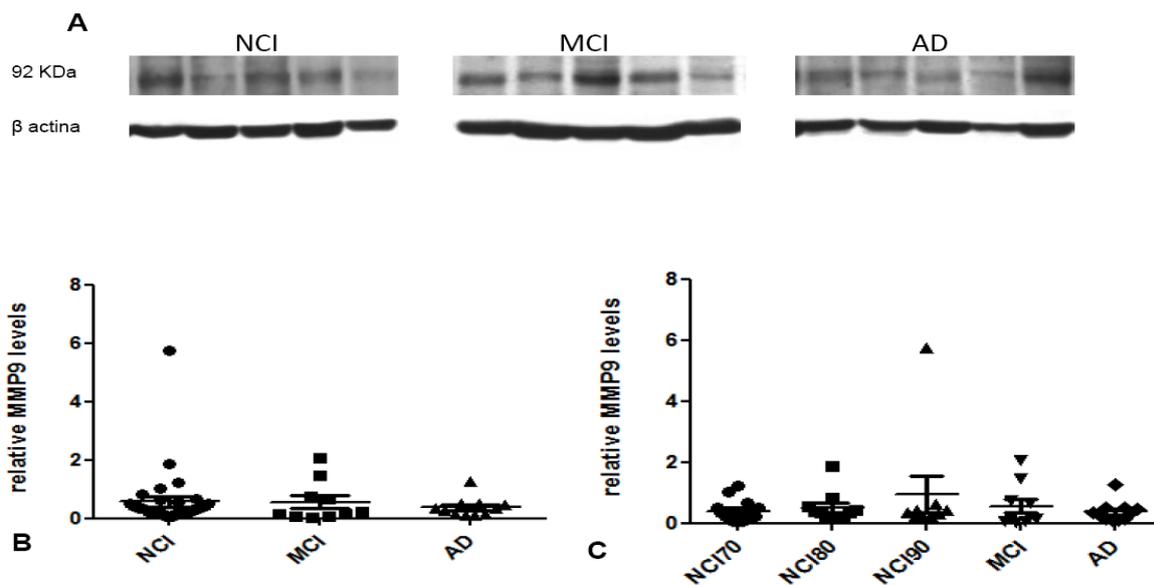


Fig.10 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di MMP-9 nel cervelletto. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

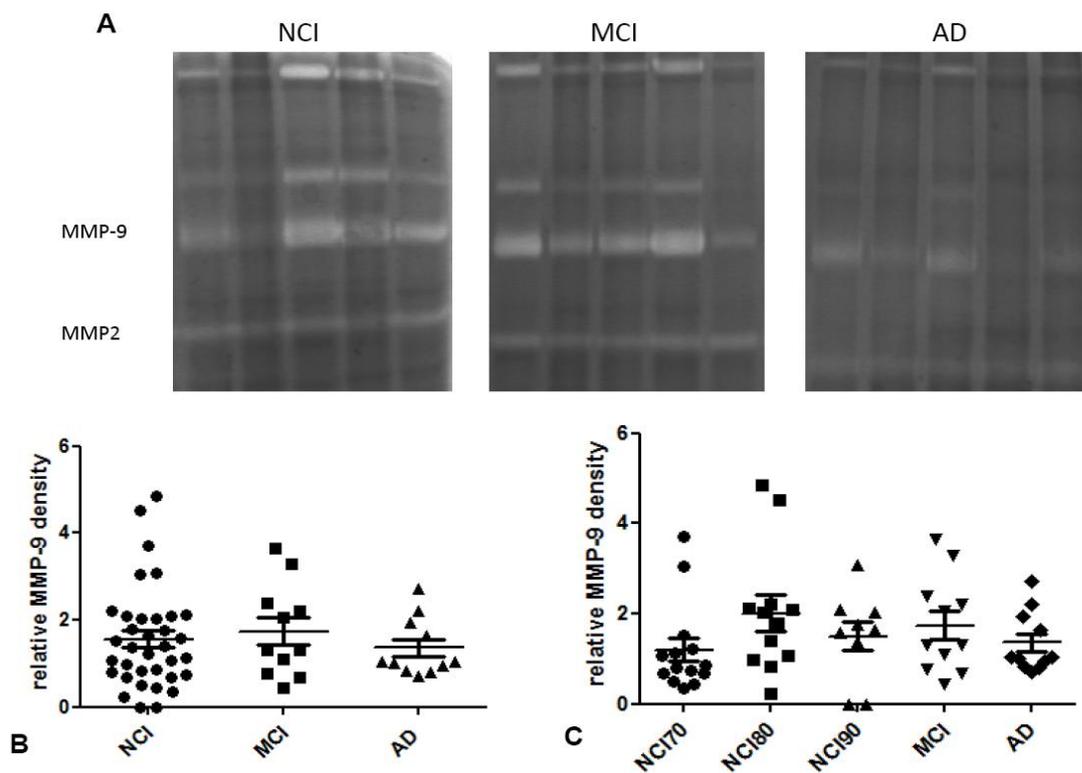


Fig.11 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati con la zimografia per valutare l'attività gelatinolitica nel cervelletto. B: Livelli relativi di attività della MMP-9 nei tre gruppi considerati. C: Analisi condotta per fasce di età.

#### 4.1.2.CD40

I livelli proteici del CD40 sono stati esaminati mediante western blot.

##### Circonvoluzione frontale media

I livelli di CD40 nella circonvoluzione frontale sono altamente variabili all'interno dei tre gruppi, con valori che si discostano molto dal valore medio (NCI = 0,91, MCI = 0,56 e AD = 0,89), risultando, in alcuni casi, anche tre volte superiori ad esso (Fig. 12 A, B, C). Il confronto tra i gruppi non mostra discrepanze significative ( $p > 0,005$ ). Come mostrato dal grafico in Fig. 12 C, la scomposizione di NCI per fasce di età e il successivo confronto con gli altri gruppi, indica livelli mediamente più alti, seppur non statisticamente significativi, nelle sottopopolazioni NCI80 e NCI90.

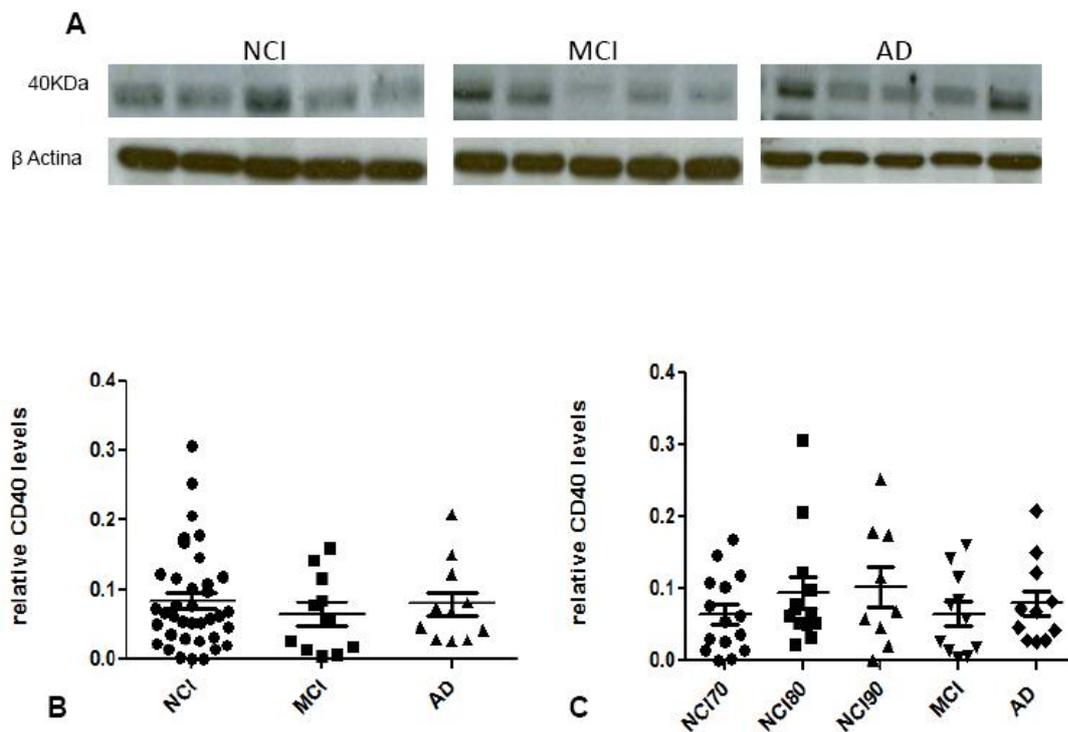


Fig.12 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di CD40 nella circonvoluzione frontale media. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

### Circonvoluzione temporale inferiore

A differenza di quanto riscontrato nella circonvoluzione frontale mediale, nella circonvoluzione temporale inferiore (Fig.13 A, B, C) i livelli di CD40 sono omogenei all'interno di ciascuno dei tre gruppi e distribuiti in modo compatto intorno al valore medio, rispettivamente di 0,76, 0,83 e 1,15 per NCI, MCI e AD. Il confronto fra i tre gruppi evidenzia un aumento dei livelli di CD40 con l'aggravarsi della patologia, con differenze statisticamente significative per la popolazione AD rispetto a quelle MCI e NCI ( $p < 0,005$ ).

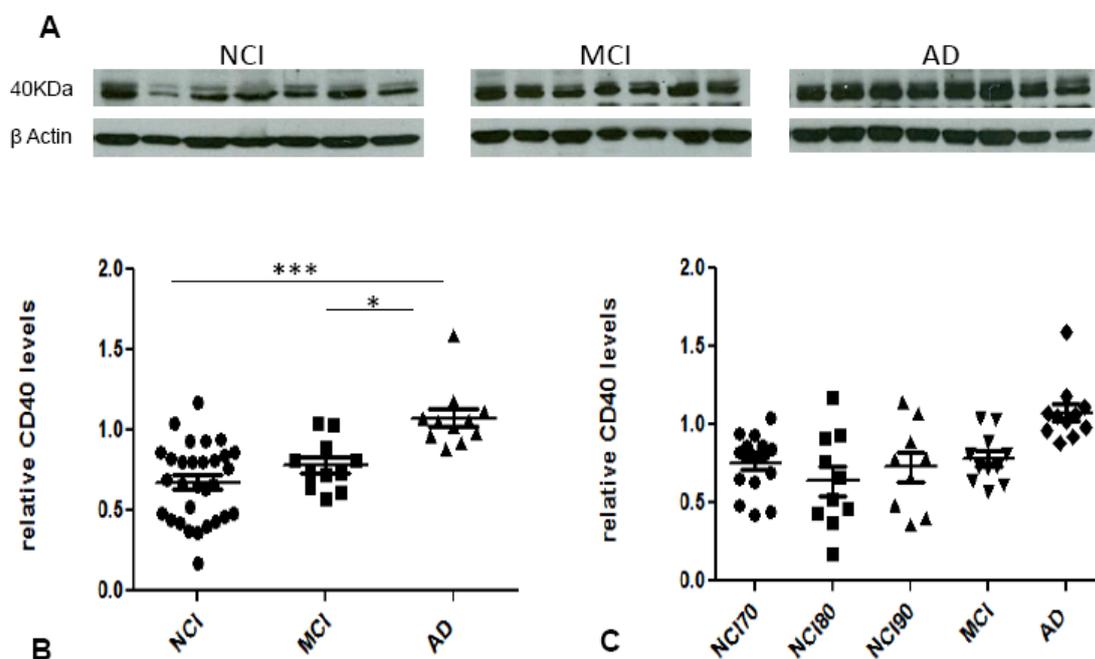


Fig.13 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di CD40 nella circonvoluzione temporale inferiore. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

### Cervelletto

Tranne qualche caso sporadico, i livelli di CD40 nel cervelletto sono più bassi rispetto alle aree corticali esaminate (Fig.14 A, B, C). I valori appaiono omogenei all'interno di ciascun gruppo e non ci sono differenze statisticamente significative fra i gruppi, per quanto quello MCI mostri livelli lievemente superiori a quelli degli altri gruppi. Se si esamina la popolazione NCI scomposta per fasce d'età, il gruppo NCI90 ha i valori superiori (Fig. 15 B).

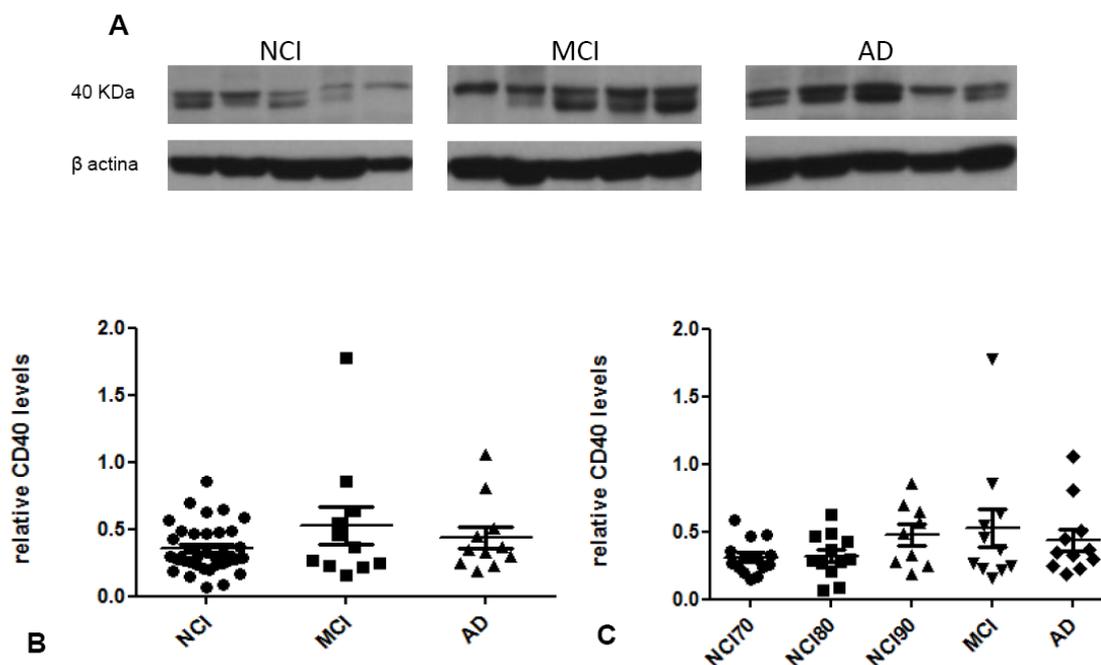


Fig.14 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di CD40 nella cervelletto. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

#### 4.1.3. Complesso maggiore di istocompatibilità di classe ii (MHCII)

I livelli proteici di MHCII sono stati esaminati mediante western blot.

##### Circonvoluzione frontale media

Come è possibile riscontrare nella Fig. 15 A, nei campioni di tutti e tre i gruppi è presente una grande variabilità nei livelli di proteina. La maggior parte dei campioni sottoposti ad indagine esprimono livelli proteici molto bassi, mentre solo una piccola percentuale di campioni mostra livelli proteici elevati rispetto ai valori medi (NCI = 0,23, MCI = 0,19 e AD = 0,20).

Il confronto tra i gruppi evidenzia una maggiore espressione di MHCII nella popolazione di controllo NCI, rispetto a MCI e AD (Fig. 16 A,B), anche se tali differenze non risultano statisticamente significative. La situazione resta inalterata anche se si scompone il gruppo NCI per fasce d'età, anche se è possibile individuare nella prima fascia d'età, NCI70, il gruppo che esprime in assoluto i livelli proteici più alti (Fig. 16 C).

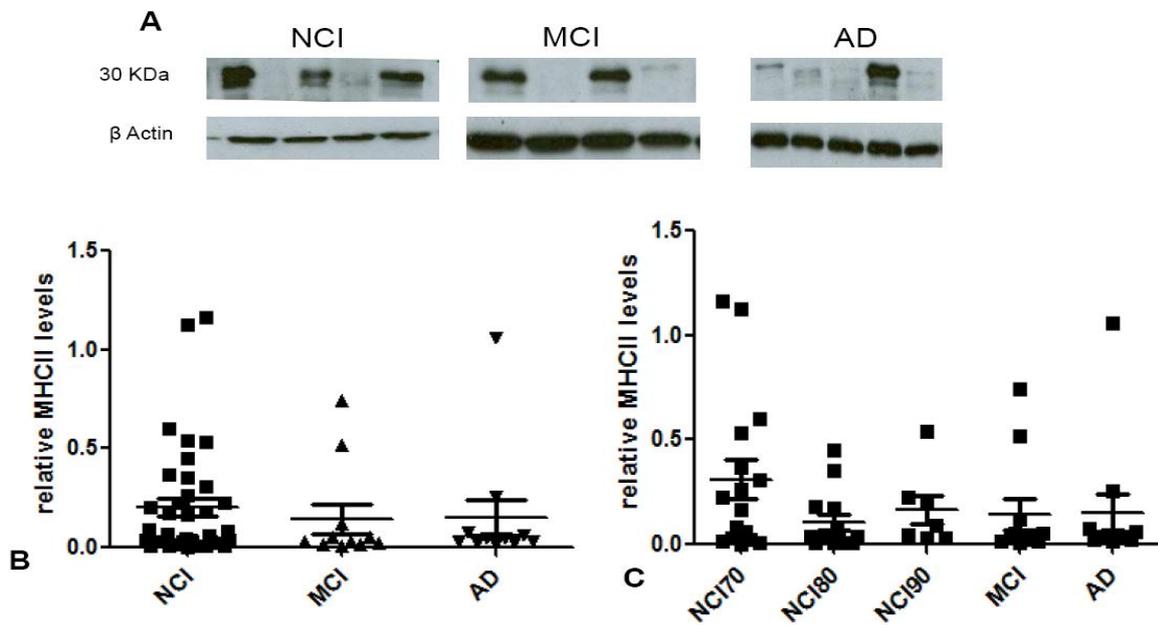


Fig.15 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di MHC II nella circonvoluzione frontale media. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

#### Circonvoluzione temporale inferiore

Nel giro temporale inferiore i gruppi MCI e AD presentano livelli di MHCII relativamente omogenei, fatta eccezione per alcuni che si discostano dal valore medio, pari a 0,64 per MCI e 0,61 per AD. Nei controlli NCI, invece, è possibile osservare una eterogeneità interna, con una prima "coorte", caratterizzata da valori molto bassi, e una seconda "coorte", che presenta valori superiori anche di tre volte rispetto alla media, che è pari a 0,69. Scomponendo il gruppo si può osservare come ci sia una marcata distinzione per fasce d'età (Fig. 16 C), con un aumento dei livelli proteici con il progredire dell'età. Tuttavia, come nella circonvoluzione frontale, anche nel giro temporale inferiore l'analisi statistica fra i gruppi non rivela differenze significative.

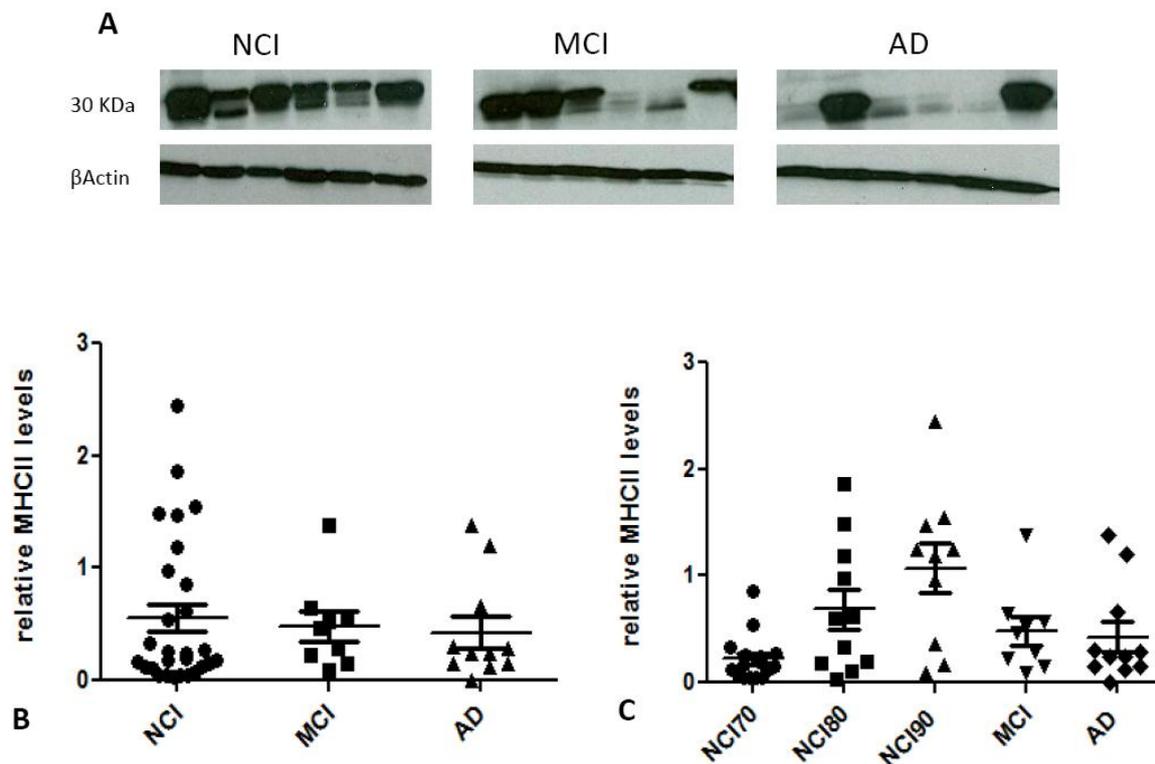


Fig.16 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di MHC II nella circonvoluzione temporale inferiore. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età

### Cervelletto

La situazione generale osservabile nel cervelletto è paragonabile a quella riscontrata nelle altre due aree cerebrali. I gruppi sono caratterizzati da livelli di MHCII generalmente bassi, con la presenza di alcuni valori discordanti rispetto alla media, 0,47 per NCI, 0,54 per MCI e 0,38 per AD (Fig. 17 A, B, C). Dal confronto tra i gruppi non si sottolineano variazioni significative ma si può osservare come nel gruppo AD siano stati rilevati valori medi inferiori a quelli degli altri due gruppi.

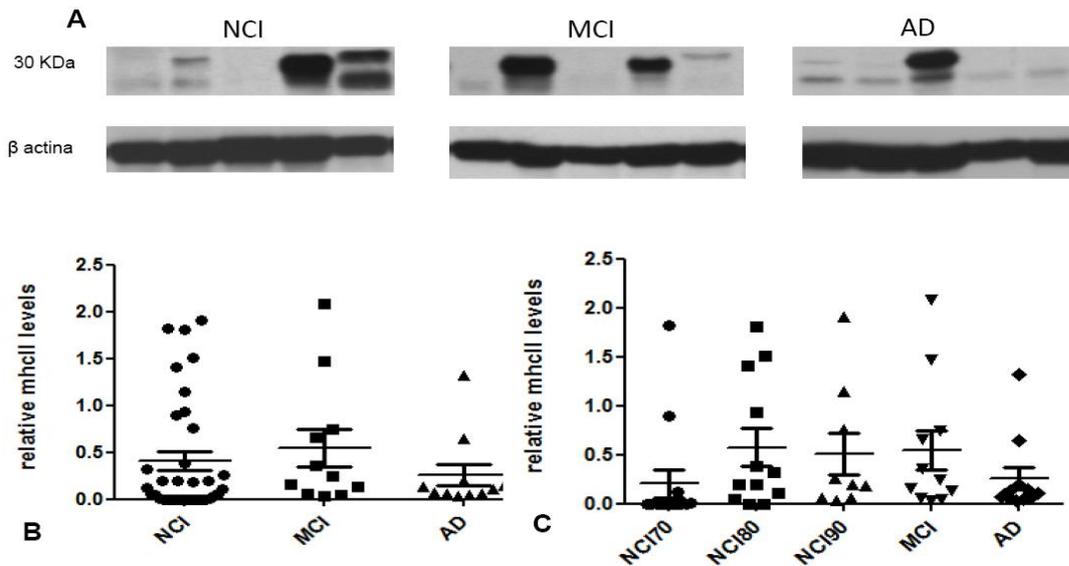


Fig.17 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di MHC II nel cervelletto. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

#### 4.1.4. Forma inducibile dell'enzima no-sintetasi (iNos)

I livelli proteici dei iNOs sono stati esaminati mediante western blot.

##### Circonvoluzione frontale media

L'indagine eseguita sulla circonvoluzione frontale media mostra una netta differenza nei livelli di iNOs fra i tre gruppi (Fig. 19 A, B, e C). Le popolazioni NCI e MCI si presentano compatte e con poca variabilità interna, mentre quella AD appare più eterogenea (Fig. 18 B). I livelli dell'enzima si mantengono molto bassi nel gruppo di controllo NCI (valore medio = 0,002) e crescono con il progredire della patologia. Il confronto fra le tre popolazioni indica una differenza significativa dei valori della popolazione AD (valore medio = 0,38) rispetto al gruppo di controllo NCI e a quello MCI (valore medio = 0,14) ( $p < 0,005$ ). L'analisi per fasce d'età della popolazione di controllo NCI indica una maggiore espressione dell'enzima nella fascia di età superiore, NCI90, mentre i livelli riscontrati in NCI70 e NCI80 sono molto vicini allo zero (Fig. 18 C). Tuttavia, la differenza tra i gruppi NCI90 e AD mantiene una significatività statistica.

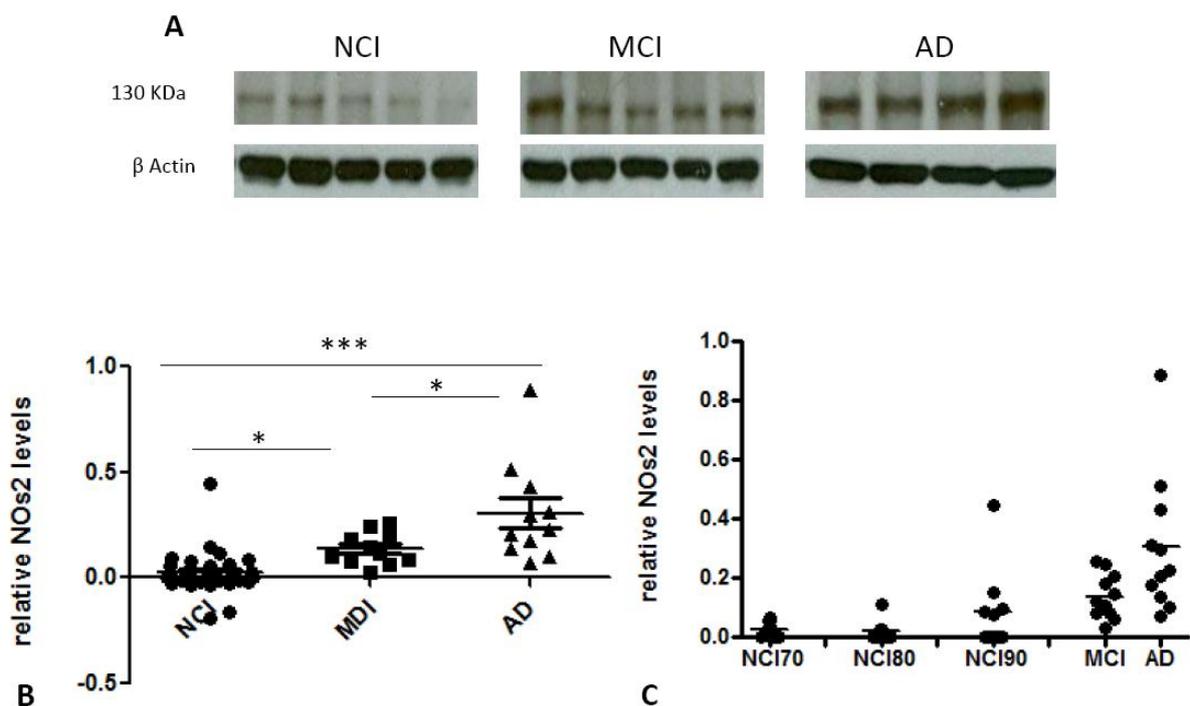


Fig. 18 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di iNOs nella circonvoluzione frontale media. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

#### Circonvoluzione temporale inferiore

Contrariamente a quanto osservato nella circonvoluzione frontale media, i livelli di iNOs riscontrati nel giro temporale inferiore sono molto bassi, ( NCI = 0,02, MCI = 0,015 e AD = 0,008) al limite della determinabilità per tutti i gruppi, per cui non sono riscontrabili differenze significative (Fig. 19 A, B e C). Solo nel gruppo NCI è possibile osservare un valore medio dei livelli enzimatici lievemente più alto dovuto alla presenza di pochi casi i cui valori si discostano notevolmente dal valore medio, pari a 0,47 per NCI80, e che ricadono nei sottogruppi NCI70 e NCI80.

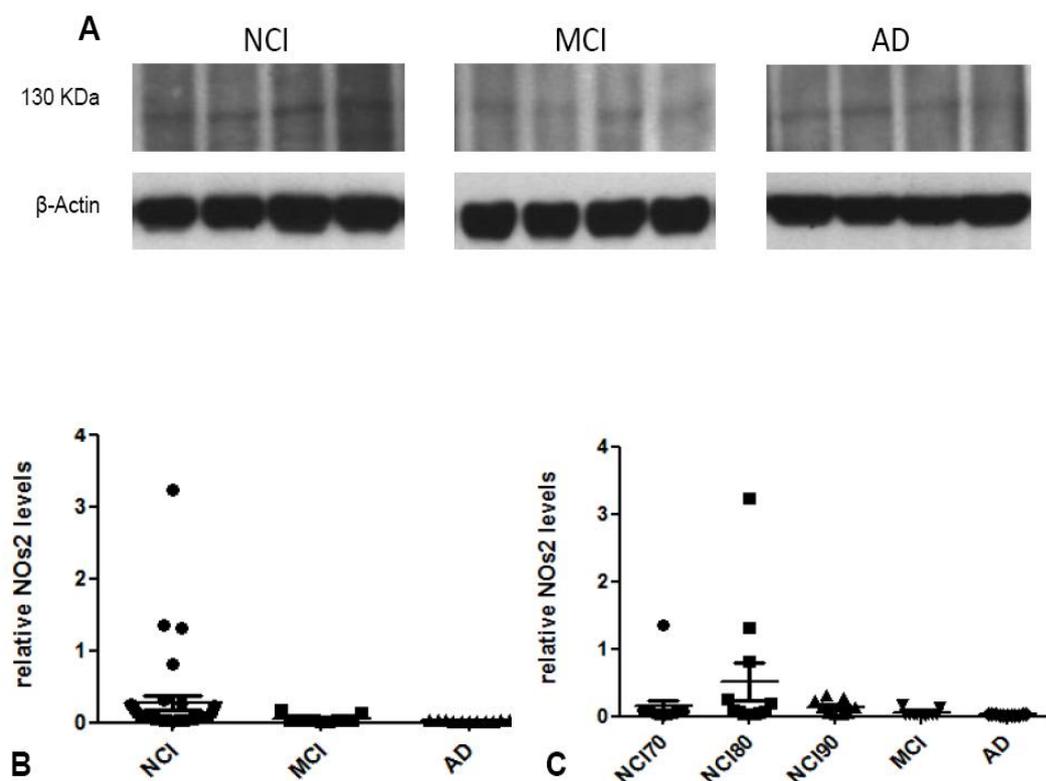


Fig. 19 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di iNOs nella circonvoluzione temporale inferiore. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

### Cervelletto

I livelli di iNOs all'interno delle popolazioni NCI e AD mostrano una forte variabilità interna, mentre il gruppo MCI si presenta omogeneo e compatto, con valori medi di 0,11 per NCI, 0,11 per MCI e 0,35 per AD. La scomposizione del gruppo NCI per fasce d'età mostra che la sua eterogeneità interna è soprattutto dovuta alla popolazione di età inferiore, NCI70 (Fig. 20 B). Confrontando i tre gruppi NCI, MCI e AD, la differenza nei valori appare statisticamente significativa fra AD e gli altri due, NCI e MCI, i quali ultimi presentano valori di livelli proteici medi simili.

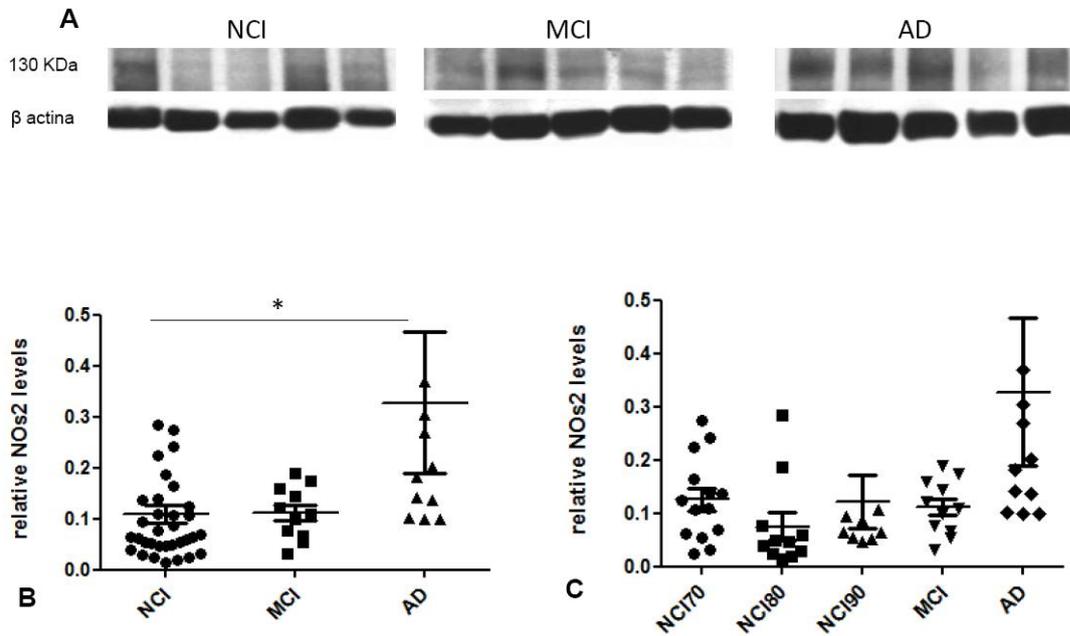


Fig. 20 A: Campione rappresentativo dei soggetti analizzati per valutare i livelli di iNOs nel cervelletto. B: Grafico dei valori ottenuti per i tre gruppi analizzati. C: scomposizione per fasce d'età.

#### 4.1.5. Interferone gamma (IFN $\gamma$ )

Per analizzare la presenza di IFN $\gamma$  nelle aree in esame è stato utilizzato il metodo ELISA.

##### Circonvoluzione frontale media

Mentre i soggetti appartenenti al gruppo AD presentano valori molto omogenei tra loro, in entrambe le popolazioni NCI e MCI sono presenti soggetti i cui livelli di IFN $\gamma$  si discostano notevolmente dalla media, pari a 74 per NCI, 185 per NCI e 32 per AD) (Fig. 21 A e B) Caratteristica è la situazione che si riscontra nel gruppo MCI, che è diviso a metà in due sottogruppi, uno con livelli di IFN $\gamma$  all'incirca doppi rispetto al valore medio e l'altro con livelli di IFN $\gamma$  pari alla metà o ancora meno rispetto al valore medio. Dal confronto tra i gruppi si evince che tali differenze hanno una netta significatività statistica (\*\* NCI vs MCI) (\*\* MCI vs AD) ( $p < 0,005$ ) per i soggetti MCI rispetto agli altri gruppi in esame. Complessivamente, si può constatare un aumento dei livelli proteici nella fase pre-clinica della malattia, MCI, con un incremento

tre volte superiore ai valori riscontrati nel gruppo di controllo e negli AD. In quest'ultimo, i livelli di IFN $\gamma$  sono addirittura più bassi rispetto a quelli dei controlli.

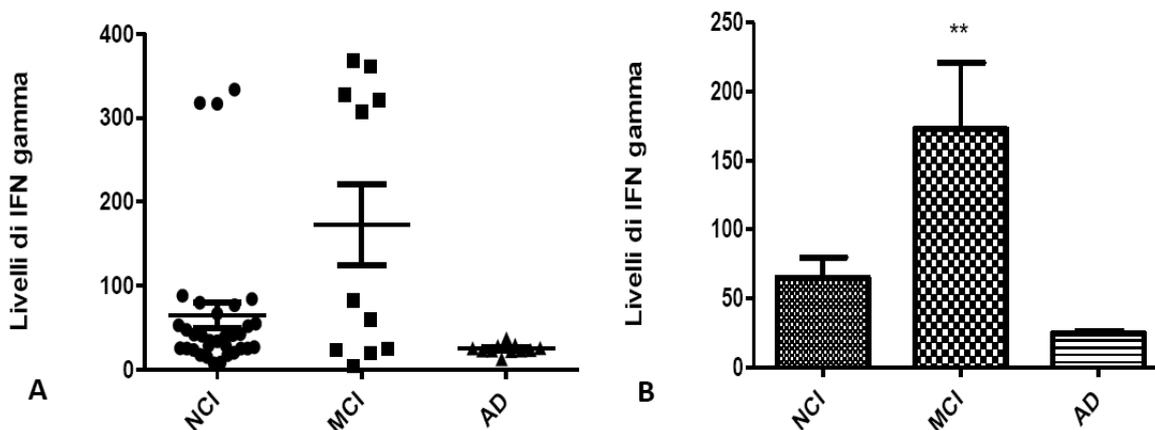


Fig.21 A e B Livelli proteici di IFN-gamma misurati nella circonvoluzione frontale media.

#### Circonvoluzione temporale inferiore

Al contrario di quanto osservato nella circonvoluzione frontale media, nella circonvoluzione temporale inferiore le popolazioni NCI e MCI sono caratterizzate da livelli proteici distribuiti in modo omogeneo intorno al valore medio (NCI = 52, MCI = 53, AD = 167) , mentre nel gruppo AD c'è una notevole variabilità interna, con soggetti i cui livelli proteici si discostano positivamente e negativamente dal valore medio (Fig. 22 A e B). Confrontando i tre gruppi si osserva la netta significatività statistica delle differenze fra AD e NCI ( \*\*\*AD vs NCI) e fra AD e MCI ( \*\*\*AD vs MCI), ( $p < 0,005$ ). All'opposto, non si osservano situazioni di divergenza tra NCI e MCI, caratterizzate da uguali valori proteici medi.

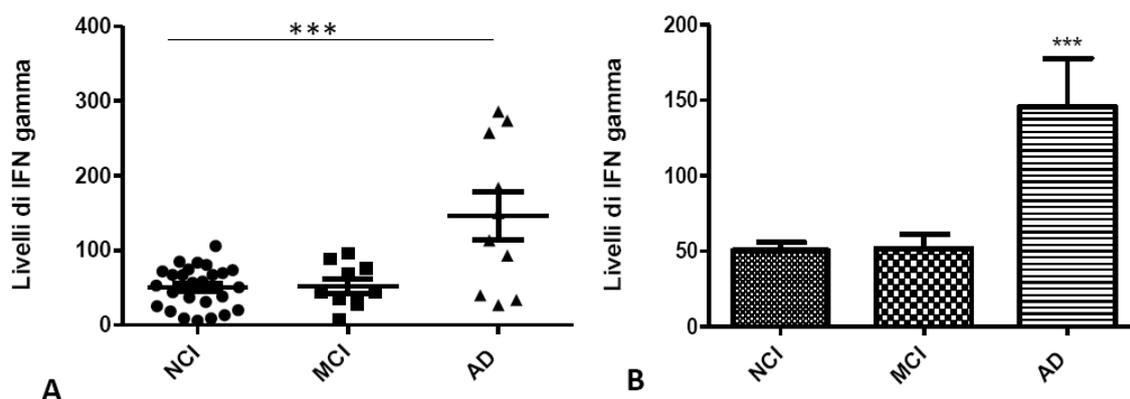


Fig.22 A e B Livelli proteici di IFN-gamma misurati nella circonvoluzione temporale interiore.

#### Cervelletto

I risultati ottenuti nel cervelletto sono in parte simili a quanto osservato nella circonvoluzione frontale media, poiché la popolazione MCI mostra un valore medio, pari a 87, dei livelli proteici di IFN $\gamma$  più elevato rispetto alle altre due popolazioni, NCI = 48 e AD = 75 (Fig. 23 A e B). La differenza raggiunge una significatività statistica rispetto al gruppo NCI, (\* MCI vs NCI) ( $p < 0.005$ ), I livelli proteici di IFN $\gamma$  negli AD sono inferiori a quelli del gruppo MCI, pur mantenendosi mediamente superiori rispetto ai valori riscontrati nel gruppo di controllo.

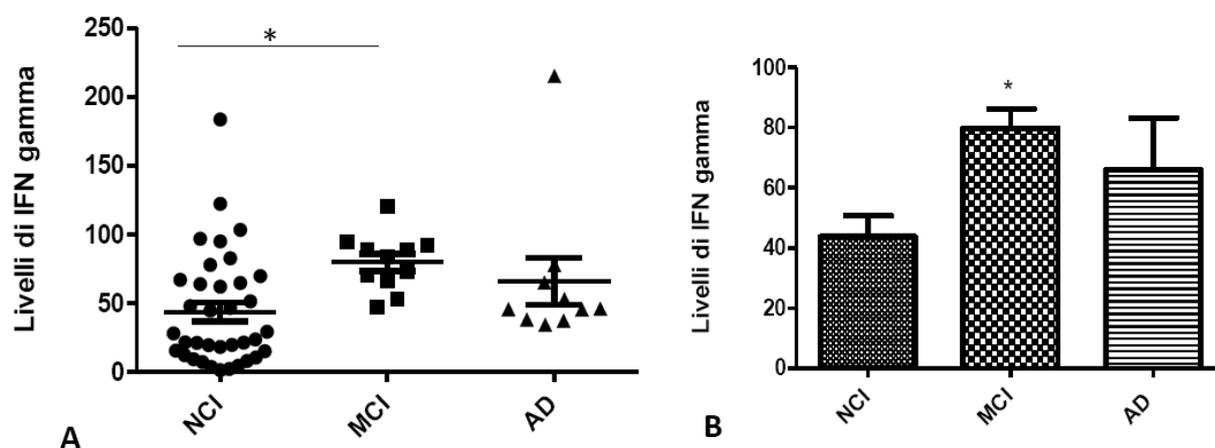


Fig.23 A e B Livelli proteici di IFN-gamma misurati nel cervelletto.

**Tab. 2** Tabella riassuntiva con i risultati ottenuti per ogni marker nelle aree cerebrali analizzate

<b>Marker</b>	<b>Circonvoluzione Frontale Media</b>	<b>Circonvoluzione Temporale Inferiore</b>	<b>Cervelletto</b>
MMP-9 (livelli proteici)	Nessuna significatività	*AD vs MCI	Nessuna significatività
MMP-9 (attività enzimatica)	Nessuna significatività	*** AD vs NCI ** AD vs MCI	Nessuna significatività
iNOs	*** AD vs NCI * AD vs MCI * MCI vs NCI	Nessuna significatività	* AD vs NCI
CD40	Nessuna significatività	*** AD vs NCI ** AD vs MCI	Nessuna significatività
MHCII	Nessuna significatività	Nessuna significatività	Nessuna significatività
IFN- $\gamma$	** MCI vs NCI/ AD	*** AD vs MCI/ NCI	* MCI vs NCI

## 4.2. CAMPIONI DI RATTO

### 4.2.1. MMP-9 nel liquido cerebrospinale

Effetto della somministrazione intraippocampale di oligomeri di A $\beta$ .

I risultati della zimografia condotta sui campioni di CSF da ratti Fischer-344 trattati con iniezioni intraippocampali di oligomeri di A $\beta$ 1-42 e relativi controlli (A $\beta$ 42-1, LPS o solo veicolo) indicano che il trattamento con oligomeri di A $\beta$  è in grado di indurre un aumento dell'attività gelatinolitica di MMP-9 rispetto ai controlli, con valori paragonabili a quelli ottenuti dopo il trattamento con LPS (Fig. 24). Seppure di entità minore, anche il trattamento con il peptide inverso, A $\beta$  42-1, induce un modesto aumento dell'attività enzimatica. Sono state valutate anche altre bande di digestione, MMP2 e dimeri di MMP-9, presenti nel gel. Per quanto riguarda le MMP2, non sono state riscontrate differenze tra i gruppi. I risultati ottenuti forniscono importanti indicazioni scientifiche sul ruolo dell' MMP-9 nella malattia di Alzheimer, ma le ridotte dimensioni delle popolazioni campione analizzate rendono necessarie ulteriori indagini.

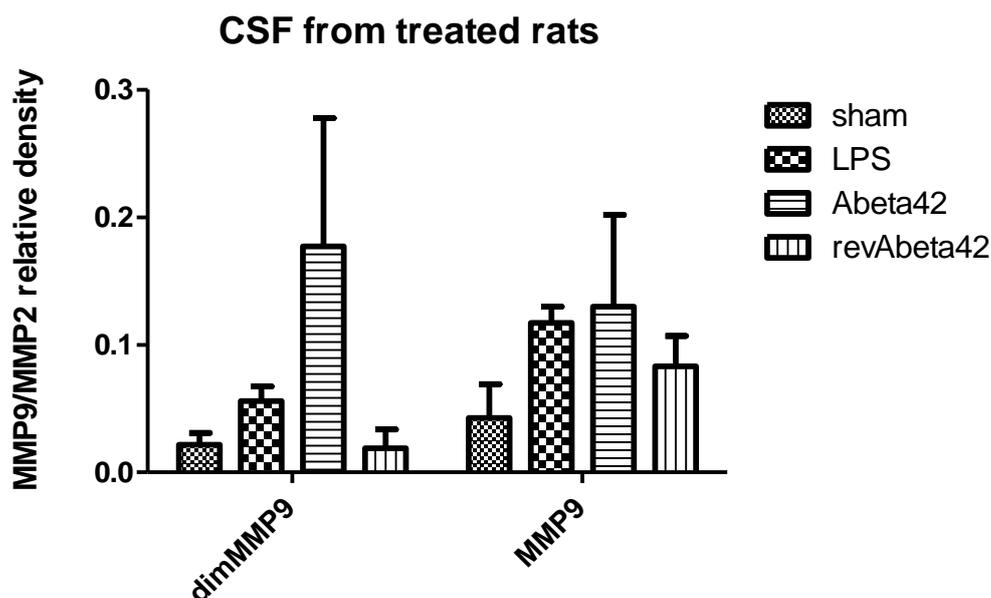


Fig.24 Misurazione dell'attività gelatinolitica nel CSF di ratti wild-type dopo trattamento acuto.

#### 4.2.2. Espressione di MMP-9 nel CSF di nei ratti transgenici McGill-R-Thy1-APP.

La zimografia del CSF per la MMP-9 dimostra una aumentata attività gelatinolitica negli animali transgenici eterozigoti (tg+/-) rispetto ai controlli wt della stessa colonia e agli stessi transgenici omozigoti (tg+/+) (Fig. 25). Anche questi ultimi due gruppi differiscono tra loro e gli animali transgenici omozigoti (tg+/+) presentano livelli di attività enzimatica moderatamente più elevati rispetto ai controlli wt.

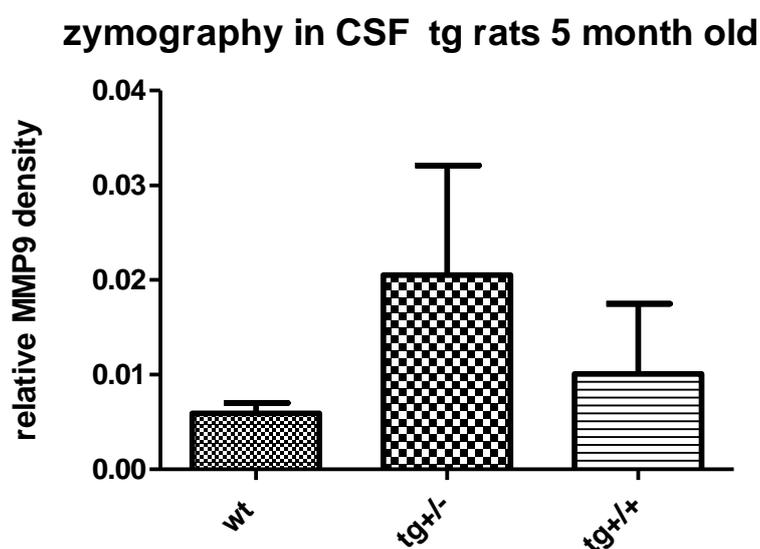


Fig.25 Misurazione dell'attività gelatinolitica nel CSF di ratti transgenici eterozigoti e omozigoti e nei wild-type della stessa linea (McGill-R-Thy1-APP)

#### 4.2.3. Immunoistochimica e Zimografia in situ per MMP-9

Nelle sezioni coronali di ippocampo, la localizzazione in immunofluorescenza dell'enzima MMP-9 rivela una marcatura (rossa; A,B;C) in forma di punti e granuli, mentre l'attività gelatinolitica in situ appare come una marcatura (verde; D,E,F) di densità variabile. Nel confronto fra i tre gruppi di animali, l'immunoreattività per l'MMP-9 è più scarsa nei ratti wt (prole della linea transgenica McGill-R-Thy1-APP) (Fig. 26A), rispetto a quella osservabile nei ratti transgenici eterozigoti (Fig. 26B) e omozigoti (Fig. 26C). In parallelo, la fluorescenza verde derivante dall'attività gelatinolitica, appare più scarsa nei ratti wt (Fig. 26A) e omozigoti (Fig. 26C) rispetto agli eterozigoti (Fig. 26B). La tripla marcatura con la colorazione DAPI suggerisce che l'enzima e l'attività proteolitica siano localizzati a livello neuronale.

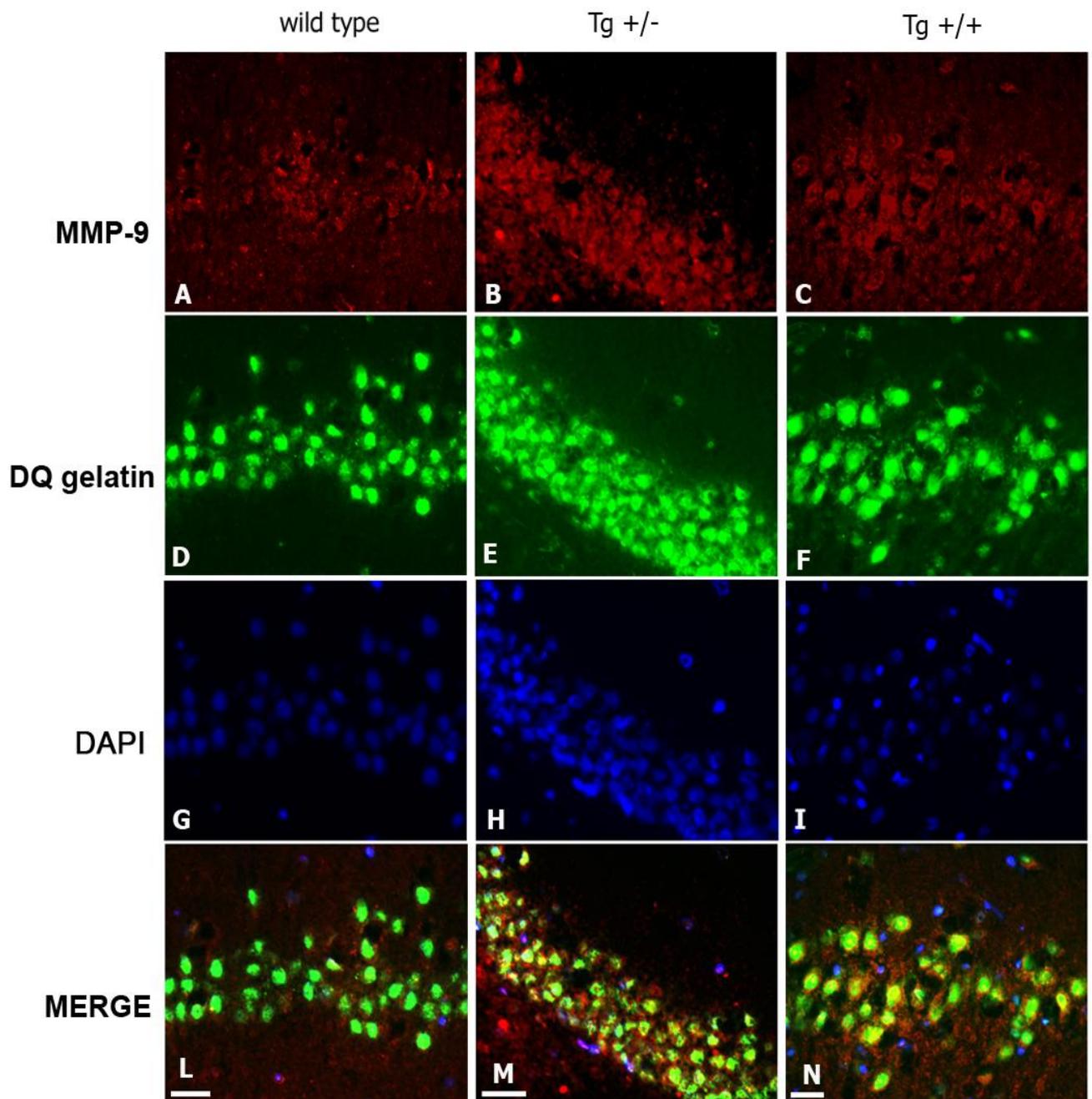


Fig.26 Ippocampo di ratto. Immunocolorazione per MMP-9 (A, B, C), zimografia in situ per MMP (D,E,F) e colorazione DAPI (H, I, L) nello strato piramidale del settore CA1 del corno d'Ammon. Le foto in L, M e N rappresentano l'immagine composta risultante dalla sovrapposizione delle singole colorazioni riportate in A-D-G, B-E-H e C-F-I rispettivamente. Barre di calibrazione: L (= A,D,G), M (= B,E,H), N (= C,F,I) = 25  $\mu$ m.

## 5. DISCUSSIONE

E' ormai ampiamente riconosciuto che l'infiammazione di strutture nervose, ovvero la neuroinfiammazione, è una caratteristica comune a tutti i disordini neurologici. Ad esempio, nella sclerosi multipla il SNC appare infiltrato da varie sottopopolazioni leucocitarie (Vanderlocht et al., 2007; Holman et al., 2011). Inoltre, anche quando una infiltrazione infiammatoria non è evidente, come nel morbo di Parkinson o in quello di Alzheimer, esiste comunque una intensa attivazione microgliale con un conseguente aumento di molti mediatori dell'infiammazione all'interno del SNC (McGeer et al., 1988; Langston et al., 1999; Sawada et al., 2006; Wilms et al., 2007; Pabon et al., 2011). In altri tessuti, la reazione infiammatoria rappresenta un processo naturale di guarigione rispetto ad un insulto lesivo e quindi, se diretta e sviluppata correttamente, una risposta vantaggiosa per l'organismo. Non sorprende perciò che nella neuroinfiammazione si riscontrino effetti benefici, come la neuroprotezione, la mobilitazione di precursori neurali per la riparazione del danno, la remielinizzazione e la rigenerazione assonica (Vanderlocht et al., 2007; De Santi et al., 2009). D'altra parte, una vasta letteratura riporta che la neuroinfiammazione produce delle conseguenze sfavorevoli e dannose (Block et al., 2007; Hirsch and Hunot, 2009; Van Noort et al., 2011) ed evidenzia una stretta correlazione tra neuroinfiammazione e malattia neurodegenerativa, nonostante risulti ancora poco chiaro se la comparsa di processi flogistici causi o sia il risultato del processo neurodegenerativo ( Matzinger. 2002; McNull et al., 2010).

Per quanto l'idea di una possibile associazione tra malattia di Alzheimer e processo flogistico sia stata inizialmente fortemente respinta, all'interno della comunità scientifica esiste ormai un'ampia convergenza nell'affermare che la componente neuroinfiammatoria rivesta un ruolo cruciale nella malattia di Alzheimer (McGeer et al 2005; Rojo et al., 2007; Cuello et al.,2010). Numerose evidenze scientifiche rivelano che nel cervello di soggetti affetti da AD molecole proinfiammatorie, quali citochine, chemochine e fattori del complemento, sono up-regulate (Akiyama et al., 2000) e che cellule di microglia attivata rilasciano specie reattive dell'ossigeno (Good et al., 1996; Ando et al., 1997; Smith et al., 1997). Inoltre la presenza di microglia attiva, localizzata in prossimità dei siti di deposito del peptide amiloide, è stata dimostrata sia in modelli murini che over-esprimono APP, sia su tessuto da pazienti affetti da AD (Morgan et al., 2005). È ampiamente accettato che la presenza neuroni danneggiati, grovigli neurofibrillari e depositi di peptide amiloide presenti nel cervello AD siano causa dell'instaurarsi di processi flogistici localizzati e cronici. Tuttavia, tali caratteristiche morfologiche (placche, grovigli e danno neuronale), patognomoniche della

malattia, sono riscontrabili anche in pazienti in stadi pre-clinici della patologia e ancora non è noto quando il processo infiammatorio si sviluppi e se esso sia un evento primario o secondario nella evoluzione verso la malattia e nella sua progressione. Esperimenti condotti sul CSF e sul cervello di pazienti MCI, caratterizzati da una condizione cognitiva intermedia tra soggetti sani e malati di AD, mostrano elevati livelli di molecole pro infiammatorie (Galimberti et al., 2006; Parakicova et al., 2007; Bruno et al., 2009), suggerendo la comparsa di tali fenomeni già nelle fasi antecedenti la patologia conclamata.

La comprensione dei meccanismi che determinano la comparsa di fenomeni neuroinfiammatori nella patologia di Alzheimer è tuttora frammentaria e attualmente numerosi sono gli interrogativi ancora irrisolti. Nel tentativo di acquisire nuove conoscenze che possano consentire una maggiore comprensione dei meccanismi alla base della patologia, anche nel laboratorio del Dr A.C. Cuello, alla McGill University, sono state intraprese linee di ricerca volte ad indagare i processi neuroinfiammatori sia nel ratto che sul tessuto umano. Il Dr Cuello e i suoi collaboratori hanno recentemente dimostrato che la somministrazione intra-ippocampale di oligomeri di A $\beta$  in ratti wild type è sufficiente ad indurre l'attivazione delle cellule di microglia, caratterizzata da una maggiore espressione di iNOs, CD40 e attività dell'MMP-9, e che il pre-trattamento con minociclina (tetraciclina con proprietà antinfiammatorie) è in grado di prevenire la comparsa di questi eventi (Bruno et al., 2009). Anche nel modello murino transgenico McGill-Thy1-APP è stata osservata la presenza di processi pro-infiammatori nelle fasi antecedenti alla deposizione di placche amiloidi, ma concomitante con l'accumulo di A $\beta$  intracellulare nei neuroni piramidali della corteccia (Ferretti et al., 2010a,b). Lo studio della patologia sul tessuto umano ha consentito di individuare alterazioni nell'attività dell'MMP-9 in soggetti MCI e la correlazione tra l'aumento dell'attività enzimatica riscontrata a livello corticale e il deficit cognitivo (Bruno et al., 2009), indicando in questa molecola un potenziale marker di diagnosi precoce.

Questi incoraggianti risultati sono stati alla base del mio progetto di ricerca, indirizzato ad ampliare lo studio della componente infiammatoria non solo nelle fasi precliniche e cliniche della patologia, ma anche nella popolazione di controllo con capacità cognitive nella norma, con l'intento di riuscire ad individuare la presenza di segnali spia, alterazioni nell'espressione di particolari molecole infiammatorie, che possano essere considerati indicatori di una eventuale condizione patologica ancora sintomatologicamente silente o comunque di una probabile evoluzione nel tempo verso la patologia. La possibilità di utilizzare tessuto umano, e in particolare quello con le caratteristiche dovute alla peculiarità del metodo con cui la raccolta è stata fatta tramite il Religious Orders Study, rappresenta uno strumento

preziosissimo per questo studio. Tuttavia, per preservare l'obiettività e l'attendibilità dell'indagine scientifica, informazioni riguardanti specifiche classificazioni cliniche e altri aspetti di carattere generale sui singoli individui (come educazione, sesso e stato cognitivo) non mi sono state fornite dal Rush Medical Center. L'unica informazione resa nota al termine degli esperimenti è stata la segregazione dei campioni nei tre gruppi: NCI, MCI e AD. Pertanto, i dati ottenuti sui tessuti umani soffrono al momento di una notevole limitazione nella possibilità di correlazione con le probabili variabili presenti all'interno dei vari gruppi e attualmente a me sconosciute, e di elaborazione statistica. Essi rappresentano tuttavia l'inizio di un percorso che ha una valida base razionale e che potrà offrire una serie di dati comunque di rilevanza scientifica.

Commenterò ora brevemente i risultati ottenuti sui singoli marker considerati.

#### MMP9

L'accumulo di A $\beta$ , conseguente allo sbilanciamento della processazione di APP verso la via amiloidogena a cui si correla il deficit cognitivo nella malattia di Alzheimer (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999; Naslund et al., 2000), sembra agire direttamente sulla rilascio di MMP-9 (Walker et al., 2006). Inoltre, numerose evidenze scientifiche supportano l'idea che nella malattia di Alzheimer le metalloproteasi possano giocare un ruolo importante nei meccanismi neuroinfiammatori agendo sul metabolismo e sulla clearance di A $\beta$  (Backstrom et al., 1996; Yan et al., 2006). I risultati delle mie indagini mostrano livelli proteici aumentati nella circonvoluzione temporale inferiore negli individui del gruppo AD rispetto a quelli dei gruppi NCI e MCI. La valutazione dell'attività gelatinolitica condotta sulla stessa area conferma una condizione di attività enzimatica significativamente più elevata nel gruppo AD rispetto a quelli NCI e MCI. Le analisi condotte sul tessuto delle altre aree cerebrali, circonvoluzione frontale media e cervelletto, non evidenziano condizioni di rilevante differenza fra i gruppi, per quanto nella circonvoluzione frontale media l'attività gelatinolitica appaia lievemente più elevata nel gruppo MCI rispetto agli altri due. Da tali osservazioni si può ribadire il ruolo dell'MMP-9 nelle fasi di patologia conclamata. Tuttavia, i risultati che ho potuto raccogliere finora non confermano quanto affermato da Bruno e collaboratori (2009), i quali dimostrarono aumentati livelli di attività gelatinolitica in pazienti affetti da MCI, suggerendo un ruolo di questa molecola nelle fasi pre-cliniche della malattia. Ciononostante, ulteriori verifiche sarebbero auspicabili prima di arrivare ad escludere che l'analisi di questo marker possa fornire indicazioni predittive sullo sviluppo della malattia.

## CD40

E' considerato ormai certo che il marker CD40 rappresenti un indicatore dell'attivazione delle cellule di microglia, e che la sua espressione sia up-regolata in presenza di A $\beta$  (Nguyen et al, 1998; Tan et al., 1999). Altri lavori evidenziano la presenza di un'elevata espressione di CD40 sulle cellule di microglia attivate nei soggetti AD (Togo et al, 2000; Calingasan et al. 2002; Giunta et al., 2010). Nel mio studio, la valutazione dei livelli di espressione della proteina CD40, evidenzia risultati discordanti fra le tre aree analizzate. Nella circonvoluzione temporale inferiore si assiste ad un incremento dei livelli di CD40 con il manifestarsi della patologia. I pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer presentano infatti una maggiore espressione del recettore CD40, indice di una maggiore attivazione delle cellule di microglia. I livelli di CD40 negli altri due gruppi sono moderati e si mantengono al di sotto dei livelli raggiunti negli AD. Tali osservazioni sono in accordo con i dati che indicano l'importanza di questo recettore nelle fasi cliniche della patologia (Togo et al., 2000; Calingasan et al., 2002), mentre, d'altra parte, non forniscono indicazioni chiare circa il suo coinvolgimento nelle fasi precliniche e asintomatiche della stessa. Nella circonvoluzione frontale media non si osservano differenze significative dell'espressione proteica di CD40 fra i tre gruppi, nonostante in quest'ultima area, nel gruppo di controllo siano presenti soggetti con una maggiore attivazione microgliale rispetto agli altri. Ma poichè non solo A $\beta$ , ma qualunque antigene può stimolare l'espressione del recettore CD40, non si può escludere che i soggetti NCI che presentano valori più alti rispetto alla media del gruppo siano stati in qualche modo esposti ad un'aggressione di diversa natura. D'altra parte non si può, allo stesso modo, ignorare la possibilità che in questi soggetti il potenziale insulto non possa essere rappresentato proprio da A $\beta$ . Poiché la patologia progredisce coinvolgendo progressivamente aree cerebrali diverse e la neocorteccia è una delle ultime aree coinvolte, si potrebbe supporre che nel gruppo AD quest'area non sia stata ancora interessata dalla patologia. Nel cervelletto l'espressione del recettore CD40 mostra omogeneità fra i tre gruppi e indica la mancanza di fenomeni di attivazione cellulare, in accordo con la nozione che questa sia una regione non coinvolta nei meccanismi patologici e nella progressione della patologia (Braak and Braak, 1991).

## MHCII

L'indagine su MHCII, altro indicatore dell'attivazione delle cellule di microglia, non rivela situazioni di particolare variabilità fra i gruppi studiati. Nonostante nel gruppo di controllo sia evidenziabile la presenza

di campioni con livelli proteici più elevati rispetto al valore medio, in nessuna delle aree analizzate si osserva una variazione significativa nell'espressione di MHCII fra i gruppi. Tali dati divergono da quelli ottenuti con il CD40, dove si riscontra una maggiore attivazione della microglia nella circonvoluzione temporale inferiore nei soggetti con malattia conclamata. I risultati ottenuti sembrano contrastare con i dati riportati in letteratura, secondo cui nelle malattie neurodegenerative, inclusa la AD, si osserva una maggiore espressione di MHCII nelle cellule di microglia attivate (Imamura et al., 2003; Perlmutter et al., 2004; Sawada et al., 2006). Nostri risultati ottenuti sugli animali transgenici McGill-Thy1-APP dimostrano che, insieme alla comparsa dei deficit cognitivi, si ha una up-regolazione di MHCII prima della deposizione di placche amiloidi (Cuello et al., 2010) e, d'altra parte, è stato riportato che le placche amiloidi (come pure l'LPS), che rendono la microglia citotossica, riducono l'espressione microgliale di MHCII (Butowsky et al., 2005). Considerata la corrispondenza del livello della banda risultante nei test western blot con il peso molecolare della proteina, mi sento di escludere l'esistenza di un artefatto. I risultati ottenuti, al contrario di quanto i dati ricavati sui ratti transgenici McGill-Thy1-APP (Cuello et al., 2010) hanno fatto sperare, attualmente mi inducono a pensare che la proteina MHCII non possa essere considerata come un segnale attendibile di una evoluzione verso la malattia conclamata in fasi precedenti la sua manifestazione.

#### iNOs

Lo stress ossidativo rappresenta un altro fattore implicato nei meccanismi di neurodegenerazione caratterizzanti la malattia di Alzheimer. Infatti, varie evidenze indicano che lo stress ossidativo determina la comparsa di radicali liberi dell'ossigeno, che agiscono nitrosilando proteine e macromolecole, rappresentando una delle alterazioni tipiche della patologia di AD (Smith et al., 1997; Torreilles et al., 1999; Xie et al., 2002; Luth et al., 2002). Studi di localizzazione dimostrano la presenza di iNOs sulle cellule di microglia (Smith et al., 1996), mentre un'alterata espressione di questo enzima è stata riscontrata in pazienti affetti da AD (Luth et al., 2001; 2002). Resta ancora da chiarire in quali fasi i radicali liberi dell'ossigeno possano giocare un ruolo chiave. La valutazione indiretta dello stress ossidativo in questi campioni, tramite l'analisi dell'iNOs apre uno scenario diverso da quelli osservati per i marker precedenti. Si evidenzia nella circonvoluzione frontale media e nel cervelletto una elevata espressione dell'enzima iNOs nella popolazione affetta dalla malattia. Invece, nella circonvoluzione temporale inferiore, coinvolta precocemente dalla patologia, l'enzima iNos è scarsamente espresso. Tali evidenze, in accordo con la teoria della progressione anatomica della patologia, indicherebbero un ruolo

primario dello stress ossidativo nell'instaurarsi del processo infiammatorio e una sua riduzione nei processi di flogosi cronica. Tali dati sono ragionevolmente in accordo con i risultati riportati in letteratura da cui si evince che A $\beta$  agisce inducendo un aumento dell'attività ossidativa (Ali et al., 2009) e sembra ormai associato il ruolo determinante dello stress ossidativo nella patogenesi della malattia di Alzheimer. Inoltre, evidenze significative indicano che lo stato di attivazione delle cellule di microglia si accompagna ad un simultaneo rilascio di superossido di azoto (Smith et al., 1996; Smith et al., 1997). Infatti le cellule di microglia attivate diventano neurotossiche generando perossido, un potente agente ossidante che viene prodotto nella reazione tra il superossido e il NO (Wang et al., 2004; Dringen, 2005; Li et al., 2005). Questi risultati supportano l'"ipotesi dello stress ossidativo" nell'AD, secondo cui il danno ossidativo sembra precedere la manifestazione clinica della malattia (Nunomura et al., 2000; 2001).

#### IFN- $\gamma$

I risultati ottenuti indicano la presenza di elevati livelli di IFN $\gamma$  in tutte le aree analizzate, evidenziando la presenza di questa citochina non solo nelle fasi precliniche della patologia, come dimostrato da elevati livelli nei pazienti MCI, ma anche nella malattia conclamata. Inoltre, i risultati ottenuti dall'analisi della circonvoluzione frontale media indicano la presenza di alcuni campioni nel gruppo di controllo con un'elevata espressione di IFN- $\gamma$ . Attualmente la mancanza d'informazioni riguardanti l'anamnesi dei singoli soggetti non mi consente di stabilire se in questi campioni sia evidenziabile una lieve, anche se normale, alterazione cognitiva che faccia presagire un'evoluzione verso una condizione patologica. Nella comunità scientifica il ruolo dell'IFN- $\gamma$  nella malattia di Alzheimer è ancora oggetto di dibattito. Numerose evidenze scientifiche dimostrano un importante ruolo dell'IFN- $\gamma$  nelle fasi precoci della patologia, indicando un ruolo attivo anche nei processi di sintesi di A $\beta$  e individuando in questa molecola un acceleratore della malattia di Alzheimer (McGeer et al., 1988; Blasko et al., 2001; Wheeler et al., 2006). Al contrario altri gruppi di ricerca evidenziano un ruolo attivo di questa citochina nei processi di neurogenesi (Butovsky et al., 2005 a,b; Lee et al., 2006). Considerando gli alti livelli proteici presenti nei soggetti dei gruppi MCI e AD si può indicare in questa citochina un mediatore del processo infiammatorio nelle fasi precliniche e nella progressione cronica dell'infiammazione. Inoltre, queste prime valutazioni non paiono a favore dell'utilità di questa molecola come spia di un iniziale processo patologico.

## MMP9 nel CSF di ratto

L'analisi dei campioni prelevati dal ratto conferma la possibilità di indagare e valutare la presenza delle metalloproteasi nel liquido cerebrospinale. In ratti wild-type la somministrazione acuta intra-ippocampale di oligomeri di A $\beta$ 1-42 determina l'aumento dell'attivazione delle MMP-9 rispetto ai controlli sham, e la valutazione dell'attività gelatinolitica riscontrata nel gruppo A $\beta$ 1-42 è paragonabile a quella indotta dalla somministrazione di LPS, tipico agente flogistico. L'iniezione del peptide di controllo A $\beta$ 42-1 determina, a sua volta, un lieve aumento dell'espressione dei livelli di MMP9 rispetto ai controlli, ma tale incremento non è paragonabile a quello indotto da LPS e dal peptide amiloide A $\beta$ 1-42. I risultati ottenuti indicano che il peptide amiloide può innescare un processo infiammatorio con una efficacia simile a quella del LPS, e suggeriscono che tale processo sia mediato dall'espressione della MMP-9. Si può quindi supporre una correlazione diretta tra peptide amiloide ed espressione della MMP-9. Il modesto aumento osservabile a seguito dell'iniezione con il peptide di controllo non desta sorpresa, dal momento che la somministrazione di una qualunque sostanza estranea, riconosciuta come antigene, è in grado di attivare il sistema immunitario e scatenare dei meccanismi di difesa (Fisher et al., 1910), seppur blandi, come in questo caso. La verifica dell'attività gelatinolitica tramite zimografia effettuata sul CSF rivela una maggiore espressione delle metalloproteasi negli animali eterozigoti, mentre negli omozigoti l'attività gelatinolitica è lievemente più bassa. Negli animali omozigoti di 5-6 mesi d'età si riscontra la presenza di depositi amiloidi a livello dell'ippocampo accompagnati da alterazioni comportamentali con una ridotta capacità memonica e deficit cognitivo, mentre negli animali eterozigoti della stessa età la presenza di depositi amiloidi in placche senili è ancora scarsamente identificabile e le performance cognitive appaiono lievemente ridotte rispetto agli animali di controllo, ma le capacità memoniche restano integre (Leon et al., 2010). Pertanto, gli animali eterozigoti di 5-6 mesi d'età non esprimono ancora i sintomi della malattia, mostrando caratteristiche paragonabili a quelle di una fase pre-clinica della patologia. Gli esperimenti condotti sul CSF di questi animali evidenziano una maggiore attività delle metalloproteasi negli animali eterozigoti rispetto agli animali omozigoti e questi risultati sono stati confermati anche dalle prove di zimografia in situ su sezioni di ippocampo. Vista l'univocità dei risultati sinora esposti, a sostegno del ruolo chiave di queste molecole coinvolte nel processo infiammatorio mediato da A $\beta$ , si può suggerire un potenziale ruolo della MMP-9 nelle fasi precoci della patologia. I risultati sinora esposti sono stati ottenuti in un numero ridotto di campioni e pertanto le indicazioni che forniscono necessitano di conferme. Tuttavia, è importante sottolineare che le osservazioni tratte da questi esperimenti sono in

accordo con i dati di Bruno et al. (2006) ottenuti su omogenato di tessuto cerebrale proveniente dalla stessa linea di ratti transgenici McGill-R-Thy1-APP, dove è stata riscontrata una maggiore espressione delle MMP-9 negli animali eterozigoti (modello di fase preclinica della patologia) rispetto agli animali omozigoti (modello di fase conclamata della patologia).

Il CSF, in stretta correlazione con il cervello, risente nella sua composizione di tutti i cambiamenti che avvengono nel SNC e l'utilizzo di questo liquido rappresenta un valido supporto d'indagine nello studio della malattia di Alzheimer, consentendo di analizzare variazioni di specifiche molecole indicatrici del processo patologico (Perrin et al., 2011). I risultati ottenuti sottolineano l'importanza dell'impiego del CSF come fonte di marker biochimici nello studio della malattia di Alzheimer. L'utilizzo del liquido cerebrospinale nei ratti transgenici offre la possibilità di effettuare studi longitudinali consentendo un monitoraggio costante di tutte le fasi della patologia, dalle fasi precliniche alla malattia conclamata, e l'identificazione di biomarker che possano essere la spia di processi patologici ancora sintomatologicamente silenti.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas N, Bednar I, Mix E, Marie S, Paterson D, Ljungberg A, Morris C, Winblad B, Nordberg A, Zhu J. Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP<sub>SWE</sub> transgenic mice. *J Neuroimmunol*. 2002, 126:50–57.
- Ali AK, Banks WA, Kumar VB, Shah GN, Lynch JL, Farr SA, Fleegal-DeMotta MA, Morley JE. Nitric oxide activity and isoenzyme expression in the senescence-accelerated mouse p8 model of Alzheimer's disease: effects of anti-amyloid antibody and antisense treatments. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009 Oct;64(10):1025-30.
- Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia*. 2001, 36:165–179.
- Alzheimer A (1907) Ueber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde [On a peculiar disease of the cerebral cortex]. *Zeitschrift fuer Psychiatrie* 64, 146; 3 pages
- Ancelina ML, Christenb Y, Ritchiea K. Antioxidant therapy and cognitive decline. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2007,24(1):1-19.
- Andra K, Abramowski D, Duke M, Probst A, Wiederholt K, Burki K, Goedert M, Sommer B, Staufenbiel M (1996) Expression of APP in transgenic mice: a comparison of neuron-specific promoters. *Neurobiol Aging* 17:183–190.
- Armstrong,R.A., Beta-amyloid plaques: stages in life history or independent origin?, *Dement. Geriatr. Cogn Disord*. 1998, 9:227-238.
- Asahina M, Yoshiyama Y, Hattori T: Expression of matrix metalloproteinase-9 and urinary-type plasminogen activator in Alzheimer's disease brain. *Clin Neuropathol*. 2001, 20:60-63.
- Avila J, Perry G, Martínez-Martín P. Prospects on the origin of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010,20(2):669-72.
- Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tokes ZA: Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci*. 1996, 16:7910-7919.
- Barger SW, Smith-Swintosky VL, Rydel RE, Mattson MP. beta-Amyloid precursor protein mistreatment and loss of calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1993, 695:158-164.
- Behr D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G. Regulation of amyloid protein precursor(APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J.Biol. Chem*. 1996, 271:1613-1620.
- Bertoli-Avella AM, Oostra BA, Heutink P Chasing genes in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Hum Genet*. 2004, 114:413–438.
- Bertram L, Tanzi RE. The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res*. 2004 Oct;50(4):385-96.
- Blasko I, Ransmayr G, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstien B. Does IFN $\gamma$  play a role in neurodegeneration? *J Neuroimmunol*. 2001, 116:1–4.
- Blasko I, Veerhuis R, Stampfer-Kountchev M, Saurwein-Teissl M, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstien B. Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1 $\beta$  or tumor necrosis factor  $\alpha$  on the synthesis of A $\beta$ 1–40 and A $\beta$ 1-42 by human astrocytes. *Neurobiol Dis*. 2000, 7:682–689.

- Bok D. Evidence for an inflammatory response in age-related muscular degeneration gains new support. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 102:70543-70544.
- Boller F, Forbes MM History of dementia and dementia in history: an overview. *J. Neurol. Sci.* 1998, 158 (2): 125–33.
- Borghi R, Piccini A, Barini E, Cirmena G, Guglielmotto M, Tamagno E, Fornaro M, Perry G, Smith MA, Garuti A, Tabaton M. Upregulation of presenilin 1 in brains of sporadic, late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010 Jan 1,22(3):771-5.
- Braak H & Braak E Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of aging* 1995.
- Braak H, Braak E. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.* 1991 Apr, 1(3):213-6.
- Brayne C, Calloway P. Is Alzheimer's disease distinct from normal ageing? *Lancet.* 1988 Aug 27;2(8609):514-5.
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci.* 2005, 29:381–393.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 2005.
- Butterfield da. Amyloid b-peptide (1–42)-induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain. *Free Radical Research.* 2002, 36:1307–1313.
- Bruno MA, Mufson EJ, Wu J, Cuello AC. Increased matrix metalloproteinase 9 activity in mild cognitive impairment. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009 Dec, 68(12):1309-18.
- Bruno MA, Cuello AC. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 25,103(17):6735-40.
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci.* 2001 Mar;4(3):233-4.
- Calingasan NY, Erdely HA, Altar CA: Identification of CD40 ligand in Alzheimer's disease and in animal models of Alzheimer's disease and brain injury. *Neurobiol Aging* 2002,23(1):31-39.
- Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.*, 2003,85:1394-1401.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature.* 1992 Dec 17,360(6405):672-4.
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med.* 1997 Jan, 3(1):67-72.
- Clutterbuck AL, Harris P, Allaway D, Mobasher A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *The Veterinary Journal* 2010,108: 27-38.

- Cruts M, Van Broeckhoven C Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Ann Med.* 1998, 30:560–565. cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 1992, 359:322-325.
- Cudkowicz, M.E., and Beal, M.F. (). Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease. *Neurochemistry International.* 2003, 43:191-196.
- Cuello AC, Ferretti MT, Leon WC, Iulita MF, Melis T, Ducatenzeiler A, Bruno MA, Canneva F. Early-stage inflammation and experimental therapy in transgenic models of the Alzheimer-like amyloid pathology. *Neurodegener Dis.* 2010;7(1-3):96-8.
- D Giulian and TJ Baker. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *Journal of Neuroscience.* 1986, 6: 2163-2178
- Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 1976, 2(8000):1403.
- Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 1976 Dec 25;2(8000):1403.
- Deb S, Gottschall PE: Increased production of matrix metalloproteinases in enriched astrocyte and mixed hippocampal cultures treated with beta-amyloid peptides. *J Neurochem.* 1996, 66:1641-1647.
- DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 1990 May, 27(5):457-64.
- Del Rio-Hortega P (1937). Microglia. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System:* 481–534.
- Del Rio-Hortega P, Penfield W (1892). Cerebral Cicatrix: the Reaction of Neuroglia and Microglia to Brain Wounds. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 41: 278–303.
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S.C., Parker, I., and Glabe, C.G.. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280:17294-17300.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. Increased amyloid-beta<sub>42</sub>(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 1996 Oct 24, 383(6602):710-3.
- Eikelenboom P, Rozemuller JM, Kraal G, Stam FC, McBride PA, Bruce ME, Fraser H. Cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease but not in scrapie-affected mice are closely associated with a local inflammatory process *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol Pathol.* 1991, 60:329-336.
- Eikelenboom P, Zhan SS, van Gool WA, Allsop D. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994, 15:447-450.
- F. Bermejo-Pareja, J. Benito-Leon, S. Vega, M.J. Medrano, G.C. Roman and on behalf of the Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group, Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain, *Journal of the Neurological Sciences.* 2008, 264:63-72.
- Fisher O.. Die presbyophrone Demenz, deren anatomische Grundlage und klinische Abgrenzung. *Z Ges Neurol Psychiatry.* 1910, 3:371–471.
- Francis PT Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2003, Sep;18(Suppl 1):S15-21.
- Frank MG, Barrientos RM, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, et al. mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiol Aging.* 2005.
- Gehrmann J, Banati RB, Kreutzberg GW. Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *J Neuroimmunol.* 1993, 48:189–198

- Giulian D, Ingeman J. Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci.* 1988, 48:281–290.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein *Biochem Biophys Res Commun.* May 1984, 16;120(3):885-90.
- Glenner,G.G., Wong,C.W., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem. Biophys. Res.Commun.* 1984,120: 885-890.
- Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *BT. Ann Neurol.* 1997,41(1):17-24.
- Gomez-Isla T, Spire T, De Calignon A, Hyman BT. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol.* 2008, 89:233-43.
- Gómez-Isla T, Wasco W, Pettingell WP, Gurubhagavatula S, Schmidt SD, Jondro PD, McNamara M, Rodes LA, DiBlasi T, Growdon WB, Seubert P, Schenk D, Growdon JH, Hyman BT, Tanzi RE. A novel presenilin-1 mutation: increased beta-amyloid and neurofibrillary changes. *Ann Neurol.* 1997, 41(6):809-13.
- Gorczynski and Stanely. *Clinical Immunology.*1999, 100:428-521
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1980.
- Graham DI, Gentleman SM, Nicoll JA, Royston MC, McKenzie JE, Roberts GW, Griffin WS. Altered beta-APP metabolism after head injury and its relationship to the aetiology of Alzheimer's disease. *Acta Neurochir Suppl.* 1996;66:96-102.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.*2008,9: 857-862.
- Hardy J. Genetic dissection of neurodegenerative disease. *Clinical Neuroscience Research.* 2001,134- 141.
- Hass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 1992 Sep 24;359(6393):322–325.
- Hatanpää K, Brady DR, Stoll J, Rapoport SI, Chandrasekaran K. Neuronal activity and early neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1996 Sep,40(3):411-20.
- Hayes GM, Woodroffe MN, Cuzner ML. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J Neurol Sci.* 1987, 80:25–37
- Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease.
- Hutton M, Hardy J The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 1997, 6:1639–1646.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science.* 1984 Sep 14,225(4667):1168-70.
- Iqbal K, Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, and Grundke-Iqba I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1739:198-210.
- Ishii T, Haga S. Immuno-electron-microscopic localization of complements in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol.*1984,63:296 –300.

- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994, 13:45-53.
- Jun Tan, et al. Microglial Activation Resulting from CD40-CD40L Interaction After Amyloid Stimulation. *Science* 1999,286: 2352.
- Katzman R, Terry RD, Bick KL. (editors). *Alzheimer's disease: senile dementia and related disorders*. New York: Raven Press. 1978.
- Katzman,R., *Alzheimer's disease*, *N. Engl. J. Med.* 1986, 314:964-973.
- Katzman,R., Editorial: The prevalence and malignancy of Alzheimer disease. A major killer. *Arch Neurol*. 1976, 33: 217-218.
- Kidd, M. : *Alzheimer's disease an electron microscopical study*. *Brain* 1964, 87:307-327.
- Kidd, M.: Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 1963, 197:192-193.
- Klegeris, A. and McGeer, P.L. R-( )-Deprenyl inhibits monocytic THP 1 cell neurotoxicity independently of monoamine oxidase inhibition. *Exp. Neurol*. 2000, 166: 458-464.
- Klein WL, Stine WB, and Teplow DB. Small assemblies of unmodified amyloid  $\beta$ -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004,25:569-580.
- Kuehn BM. Inflammation suspected in eye disorders. *The Journal of American Medical Association*. 2005, 294: 31-32.
- Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, Richter D, Mutlu L, et al. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *Faseb J*. 2005, 19:1347–1349.
- Lee J, Kim SJ, Son TG, Chan SL, Mattson MP. Interferon-gamma is up-regulated in the hippocampus in response to intermittent fasting and protects hippocampal neurons against excitotoxicity. *J Neurosci Res*. 2006, 83:1552–1557.
- Leon WC, Caneva F, Partridge V, Allard S, Ferretti MT, DeWilde A, Vercauteren F, Atifeh R, Ducatenzeiler A, Klein W, Szyf M, Alhonen L, Cuello AC. A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta associated cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*. 2010, 20(1):113-26.
- Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005, 1739:198-210.
- Liu, L. et al., Longitudinal observation on CSF A $\beta$ 42 levels in young to middle-aged amyloid precursor protein/presenilin-1 doubly transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2004, 17 (3), 516.
- Lorenzl,S., Albers,D.S., Relkin,N., Ngyuen,T., Hilgenberg,S.L., Chirichigno,J.,Lorenzo A, and Yankner BA.  $\beta$ -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, 91:12243-12247.
- Luber–Narod J, Rogers J. Immune system associated antigens expressed by cells of the human central nervous system. *Neurosci Lett*. 1988,94:17–22.
- Luthi A, Van der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, Sansig G, Portet C, Schmutz M, Schroder M, Nitsch C, Laurent JP, Monard D. Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 1997, 17(12):4688-99.
- Lye TC, Shores EA Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. *Neuropsychol Rev*. 2000 Jun;10(2):115-29.

Maes M, DeVos N, Wauters A, Demedts P, Maurits VW, Neels H, Bosmans E, Altamura C, Lin A, Song C, Vandenbroucke M, Scharpe S. Inflammatory markers in younger vs elderly normal volunteers and in patients with Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res.* 1999, 33:397–405.

Marx F, Blasko I, Zisterer K, Grubeck-Loebenstien B. Transfected human B cells: a new model to study the functional and immunostimulatory consequences of APP production. *Exp Gerontol.* 1999, 34:783–795.

Matzinger P: The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002,296:301-305.

McCawley LJ, Matrisian LM Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Current Opinion in cell Biology.* 2001,13: 534-540.

McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG. Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. *Neurosci Lett.* 1989,107:341– 6.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988, 38 (8):1285-91.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988, 38:1285–91.

McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett.* 1987, 79 (1-2):195-200.

McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Neuroimmune mechanisms in Alzheimer disease pathogenesis. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1994, 8: 149-158.

McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis.* 2006,9(3 Suppl):271-6.

McGeer PL, Rogers J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology.* 1992, 42(2):447-9.

McKhann,G., Drachman,D., Folstein,M., Katzman,R., Price,D., Stadlan,E.M., Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984, 34: 939-944.

McLean,C.A., Cherny,R.A., Fraser,F.W., Fuller,S.J., Smith,M.J., Beyreuther,K., Bush,A.I., and Masters,C.L. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology.* 1999, 46:860-866.

Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by  $\beta$ -amyloid protein and interferon- $\gamma$ . *Nature.* 1995, 374:647–650.

Miller DW, Vosseler S, Mirancea N, Hicklin DJ, Bohlen P, Volcker HE, Holz FG, et al. Rapid vessel regression, protease inhibition, and stromal normalization upon short-term vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibition in skin carcinoma heterotransplants. *Am J Pathol.* 2005, 167:1389–1403.

Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S: Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008, 18:240-252.

Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa KH, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T, Yamada K: Matrix metalloprotease-9 inhibition improves amyloid beta-mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009, 331:14-22.  
Morsch R, Simon W, Coleman PD. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Feb, 58(2):188-97.

- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1992, 1(5):345-7.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science.*1991, 254(5028):97-9.
- Nagase H & Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999,274: 21491–21494.
- Naslund J., Haroutunian,V., Mohs,R., Davis,K.L., Davies,P., Greengard,P., and Buxbaum,J.D. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA.* 2000, 283:1571-1577.
- Neuroinflammation Working Group: Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000, 21:383-421.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.*2003, 39:409-421.
- Pastor P, Goate AM. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Curr Psychiatry Rep.* 2004, 6:125–133.
- Perlmutter LS, Scott SA, Barrón E, Chui HC. MHC class II-positive microglia in human brain.Association with alzheimer lesions. *Journal of Neuroscience Research* (2004)
- Perry G, Cash AD, Smith MA. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J. Biomed.Biotechnol.* 2002, 2 :120-123.
- Peskind ER. Neurobiology of Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry.* 1996, 57 Suppl 14:5-8.
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1993 Sep 18;342(8873):697-9.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein". *J. Neurosci.* 2006, 26 (27): 7212–21.
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull.* 2003, 61:1–24.
- Rockenstein E, Mallory M, Mante M, Sisk A, Masliah E Early formation of mature amyloid-b proteins deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of Ab1–42. *J Neurosci Res.* 2001, 66:573–582.
- Rodgers H, Matrisian LM, Giudice LC, Dsupin B, Cannon P, Svitek C, Gorstein F, Osteen KG () Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *Journal of Clinical Investigation.*1994, 21: 946-953.
- Rogers J, Lue LF. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2001,39: 333-40.
- Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia.* 2002,40: 260-9.
- Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Civin WH, Emmerling M, Shivers B, Rosen RF, Farberg AS, Gearing M, Dooyema J, Long PM, Anderson DC, Davis-Turak J, Coppola G, Geschwind DH, Paré JF, Duong TQ, Hopkins WD, Preuss TM, Walker LC. Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *J Comp Neurol.* 2008, 509(3):259-70.
- Rosenberg GA: Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 2009, 8:205-216.

- Rydel RE, and Rogers J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am.J.Pathol.* 1999, 155, 853-862.
- Salamonsen LA, Zhang J, Hampyon A, Lathbury L. Regulation of metalloproteinases in human endometrium. *Human Reproduction.* 2000,15:112-119.
- Saurwein-Teissl M, Blasko I, Zisterer K, Neuman B, Lang B, Grubeck-Loebenstien B. An imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, a characteristic feature of old age. *Cytokine.* 2000, 12:1160–1161.
- Sbai O, Ferhat L, Bernard A, Gueye Y, Ould-Yahoui A, Thiollou S, Charrat E, et al. Vesicular trafficking and secretion of matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci.* 2008, 39:549–568.
- Selkoe DJ. Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.*1996, 271(31):18295-18298.
- Selkoe DJ. Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994 4:708-716.
- Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid betaprotein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000, 924:17-25.
- Sjogren M. et al. Tau and Ab42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem* 2001, 47:1776-81.
- Spalletta G, Baldinetti F, Buccione I, Fadda L, Perri R, Scalmana S, Serra L, Caltagirone C. Cognition and behaviour are independent and heterogeneous dimensions in Alzheimer's disease. *J Neurol.* 2004, 251(6):688-95.
- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA & Kleiner DE, Jr. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 1993, 7:1434–1441.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar, 1;90(5):1977-81.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science.* 1994 May 27, 264(5163):1336-40.
- Tabaton M, Zhu X, Perry G, Smith MA, Giliberto L. Signaling effect of amyloid-beta(42) on the processing of AbetaPP. *Exp Neurol.* 2010 Jan,221(1):18-25.
- Talamagas AA, Efthimiopoulos S, Tsilibary EC, Figueiredo-Pereira ME, Tzinia AK: Abeta(1-40)-induced secretion of matrix metalloproteinase-9 results in sAPPalpha release by association with cell surface APP. *Neurobiol Dis.* 2007, 28:304-315.
- Tan J, Town T, Crawford F, Mori T, DelleDonne A, Crescentini R, Obregon D, Flavell RA, Mullan MJ: Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci.* 2002,5(12):1288-1293.
- Tan J, Town T, Paris D, Mori T, Suo Z, Crawford F, Mattson MP, Flavell RA, Mullan M: Microglial activation resulting from CD40- CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* 1999, 286(5448):2352-2355.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 1991 Oct, 30(4):572-80.

- Terry RD, Pena C. Experimental production of neurofibrillary degeneration. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1965, 24: 200-216.
- Terry RD. Neuronal fibrous protein in human pathology. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1971, 30: 8-19.
- Terry RD. The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1963, 22: 629 – 642.
- Todd Roach J, Volmar CH, Dwivedi S, Town T, Crescentini R, Crawford F, Tan J, Mullan M: Behavioral effects of CD40-CD40L pathway disruption in aged PSAPP mice. *Brain Res.* 2004, 1015(1-2):161-168.
- Togo T, Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Iseki E, Kosaka K: Expression of CD40 in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Brain Res* 2000, 885(1):117-121.
- Tomlinson, B.E., Blessed, G., Roth, M., Observations on the brains of demented old people, *J Neural Transm.* 2010, 117(8):919-47.
- Town JT, Paris D, Placzek A, Parker T, Crawford F, Yu H, Humphrey J and Mullan M. Activation of microglial cells by the CD40 pathway: relevance to multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology.* 1999, 97: 77-85.
- Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol.* 2000, 164:2759–2768.
- Van Dam, D., and De Deyn, P. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2006, 5:956-970.
- Van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G) Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci.* 2000, 20(16):6021-9.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999 Oct 22, 286(5440):735-41.
- Visse R & Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res.* 2003, 92: 827–839.
- Walker D, McGeer P. Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol. Aging.* 1996, 17:681-686.
- Wheeler RD, Zehntner SP, Kelly LM, Bourbonniere L, Owens T. Elevated interferon gamma expression in the central nervous system of tumour necrosis factor receptor 1-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology.* 2006, 118:527–538.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science.* 1982, 215(4537):1237-9.
- William R. Markesbery. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 1997, 23:134-147.
- Wisniewski HM, Vorbrodt AW, Wegiel J, Morys J, Lossinsky AS. Ultrastructure of the cells forming amyloid fibers in Alzheimer disease and scrapie. *Am J Med Genet Suppl.* 1990, 7:287-97.

Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, Ikezu T. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  regulate amyloid- $\beta$  plaque deposition and  $\beta$ -secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol.* 2007, 170:680–692.

Yan,P., Hu,X., Song,H., Yin,K., Bateman,R.J., Cirrito,J.R., Xiao,Q., Hsu,F.F., Turk,J.W., Xu,J., Hsu,C.Y., Holtzman,D.M., and Lee,J.M. Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *Journal of Biological Chemistry.* 2006, 281:24566-24574.

## **Ringraziamenti**

Ringrazio la Prof.ssa Marina Del Fiacco per i suoi insegnamenti, per la sua disponibilità, per aver creduto in me e per avermi sostenuto nei momenti di sconforto, ma soprattutto per aver condiviso con me la passione per la scienza.

Un vivo ringraziamento al Prof. A. Claudio Cuello e ai suoi collaboratori, in particolare Fabio Canneva, Maria Teresa Ferretti e Adriana Ducatenzeiler, per avermi guidato e sostenuto nella mia attività di ricerca presso il loro laboratorio.

Ringrazio la Prof.ssa Marina Quartu per la sua infinita disponibilità e per il suo sostegno.

Ringrazio Pina Serra, Marianna Boi, Viviana Ibba perchè amiche oltre che colleghe.