

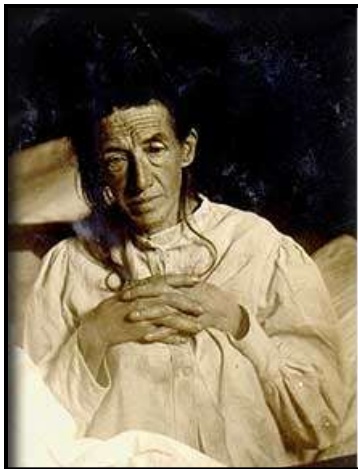
ATTENZIONE:

Lunedì 29 aprile non ci sarà lezione

MALATTIA DI ALZHEIMER



Nel 1907 Alois Alzheimer descrisse per primo un caso di demenza presenile in una donna (**Auguste D**) di 51 anni che aveva presentato disturbi della memoria e una perdita progressiva delle capacità cognitive. La paziente fu ricoverata presso un ospedale psichiatrico dove morì cinque anni dopo l'esordio della malattia.



All'autopsia, fu riscontrata la presenza di **ammassi neurofibrillari** e **placche senili nel neocortex e nell'ippocampo**.

Molte delle malattie neurodegenerative presentano entrambe le classi di sintomi in qualche momento nel corso della progressione della malattia

Due tipi principali di sintomi clinici

✓ *DEMENZE:*

disordini cognitivi, associativi, caratteriali e di memoria

✓ *DISORDINI DEL MOVIMENTO:*

Ipercinesia, **acinesia**, paralisi

Le manifestazioni cliniche dipendono dai sistemi neuronali coinvolti nel corso della malattia

CLINICA

Esordio subdolo, ≤ 70 anni

- Deficit di memoria
- Difficoltà nella risoluzione dei problemi
- Alterazioni del linguaggio (afasia)
- Alterazione dell'esecuzione dei calcoli
- Disorientamento spazio-temporale ed errori di giudizio
- Disturbi del comportamento (oscillazioni dell'umore, alterazioni della personalità, psicosi, agitazione, allucinazioni)
- Le funzioni mentali si deteriorano e le attività giornaliere vengono svolte con difficoltà crescente.
- Negli ultimi stadi della malattia i soggetti non parlano più, divengono incontinenti e sono costretti al letto in uno stato puramente vegetativo; la morte interviene in seguito ad altre malattie intercorrenti.

TERAPIA

Non esistono terapie in grado di arrestare il decorso della malattia

Terapie sintomatiche per alterazioni affettive, turbe del comportamento, disturbi del sonno, allucinazioni e disturbi cognitivi

- **SSRI** (inibitori selettivi della serotonina) **migliorano i disturbi dell'umore**
- **Inibitori dell'acetilcolinesterasi cerebrale** (Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, Galantamina) **per disturbi cognitivi**. Effetti modesti

EPIDEMIOLOGIA

Tra le patologie neurodegenerative, la **malattia di Alzheimer** è quella che ha **l'incidenza maggiore** ed è la forma più comune di demenza (55%) che si osserva nelle persone anziane.

La durata media della malattia è di 8 anni.

FATTORI DI RISCHIO EPIDEMIOLOGICI

- **Età**
- **Sesso femminile**
- **Bassa scolarità** (? Correlaz con numero di sinapsi corticali)
- **Traumi cranici** (?)
- **Anamnesi familiare positiva per Sidrome di Down**
- **Familiarità**
 - **1-2%** dei casi la mal è trasmessa in modalità **Aut/Dom** a penetranza completa (tutte le generazioni sono colpite da una forma ad esordio precoce ed aggressiva)
 - **50-60%** familiarità debole (polimorfismi genetici che predispongono alla malattia).

CNS

```
graph TD; CNS[CNS] --> Brain[Brain]; CNS --> SpinalCord[Spinal cord]; Brain --> Prosencephalon[Prosencephalon]; Brain --> BrainStem[Brain stem]; Prosencephalon --> Telencephalon[Telencephalon]; Prosencephalon --> Diencephalon[Diencephalon]; BrainStem --> Mesencephalon[Mesencephalon]; BrainStem --> Rhombencephalon[Rhombencephalon]; Telencephalon --> TelList[Rhinencephalon, Amygdala, Hippocampus, Neocortex, Basal ganglia, Lateral ventricles]; Diencephalon --> DList[Epithalamus, Thalamus, Hypothalamus, Subthalamus, Pituitary gland, Pineal gland, Third ventricle]; Mesencephalon --> MesList[Tectum, Cerebral peduncle, Pretectum, Mesencephalic duct]; Rhombencephalon --> Metencephalon[Metencephalon]; Rhombencephalon --> Myelencephalon[Myelencephalon]; Metencephalon --> MetList[Pons, Cerebellum]; Myelencephalon --> MyelList[Medulla oblongata];
```

Brain

Spinal cord

Prosencephalon

Brain stem

Telencephalon

Diencephalon

Mesencephalon

Rhinencephalon,
Amygdala,
Hippocampus,
Neocortex, Basal
ganglia, Lateral
ventricles

Epithalamus,
Thalamus,
Hypothalamus,
Subthalamus,
Pituitary gland,
Pineal gland,
Third ventricle

Tectum, Cerebral
peduncle, Pretectum,
Mesencephalic duct

Rhombencephalon

Metencephalon
Pons,
Cerebellum

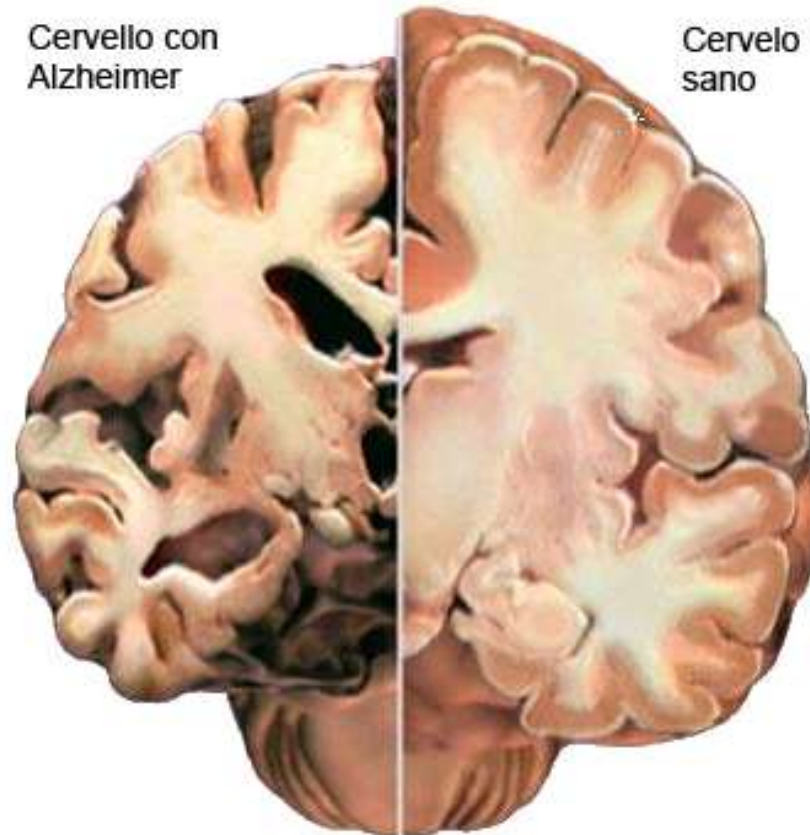
Myelencephalon
Medulla
oblongata

ISTOPATOLOGIA

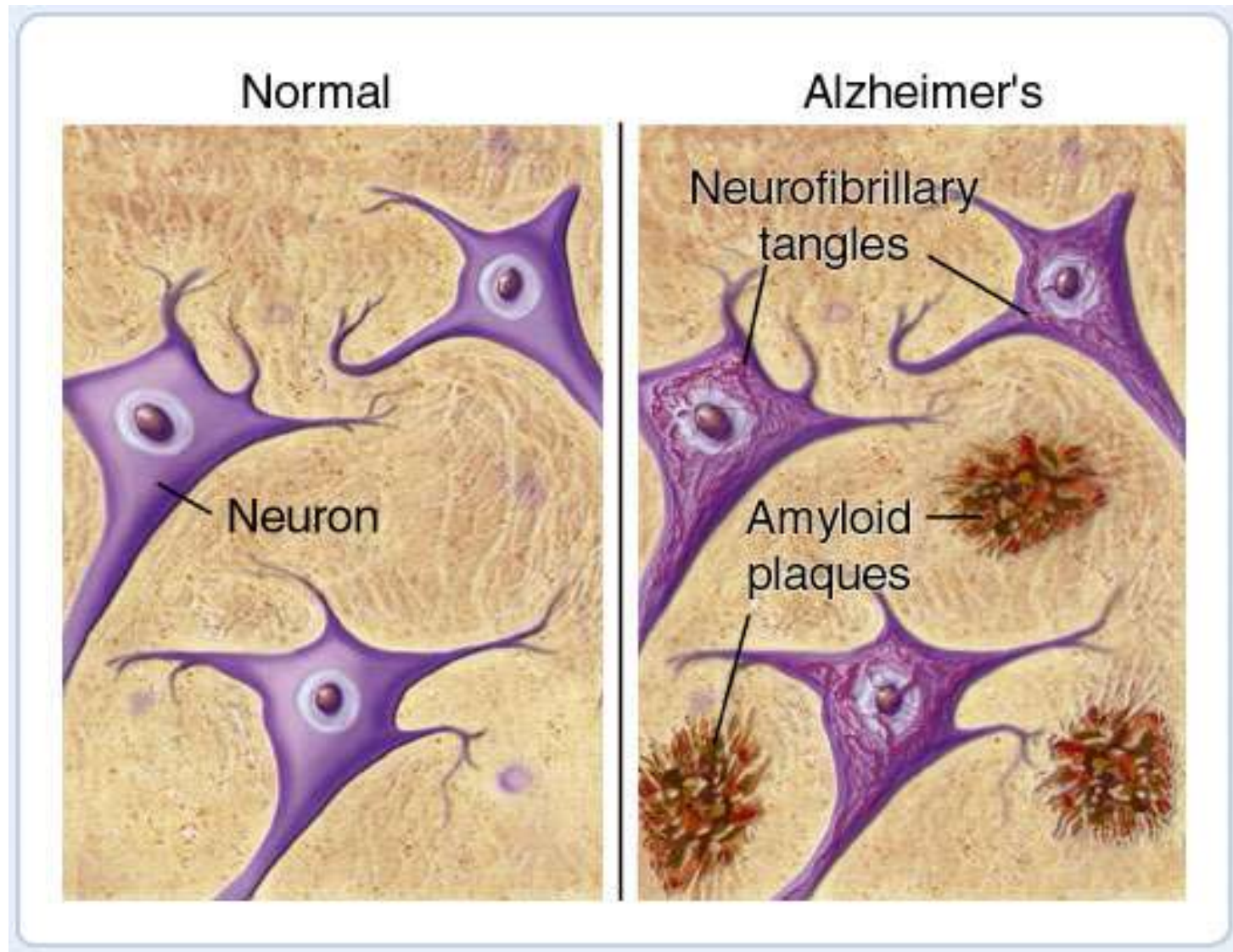
1. Neurodegenerazione di regioni cerebrali specifiche

- **Corteccia cerebrale (lobo frontale, temporale e parietale)** → depauperamento dei grandi neuroni piramidali glutammatergici, interneuroni, segue proliferazione astrocitaria.
- **Area entorinale e Ippocampo** (estremamente atrofico) zone CA1-CA2.
- **Amigdala**
- **Nucleo basale di Meynert** (punto di partenza delle principali vie colinergiche → notevole ↓ dei livelli di Acetilcolina e dei traccianti colinergici)
- **Talamo** (porzione anteriore)
- **Nuclei monoaminergici del tronco encefalico** (locus ceruleus, complesso nucleare del rafe)

Morbo di Alzheimer



Aggregati proteici



2. Presenza di depositi proteici *intracellulari*

Grovigli neurofibrillari (NFT)



Materiale che assume i coloranti d'argento, sottoforma di anse sinuose, di spirali o masse aggrovigliate, costituiti da isoforme poco solubili ed iperfosforilate della **proteina tau** (normalmente solubile ed associata ai microtubuli).

LA PROTEINA TAU

Tau fa parte della famiglia delle proteine che legano i microtubuli (MBP). Esperimenti di knock out e di overespressione di tau nel topo dimostrano che essa è coinvolta nei **processi di accrescimento dei neuriti e nel trasporto assonale**

Nel cervello : **6 isoforme** di tau, che derivano da eventi di splicing alternativo (esoni 2, 3, e 10 del gene tau)

3 isoforme con 3 domini di legame e 3 isoforme con 4 domini di legame

C-terminali carichi positivamente, che interagiscono con porzioni di MBP cariche negativamente

Healthy Neuron

Stabilizing
Tau Molecules

Microtubules

Diseased Neuron

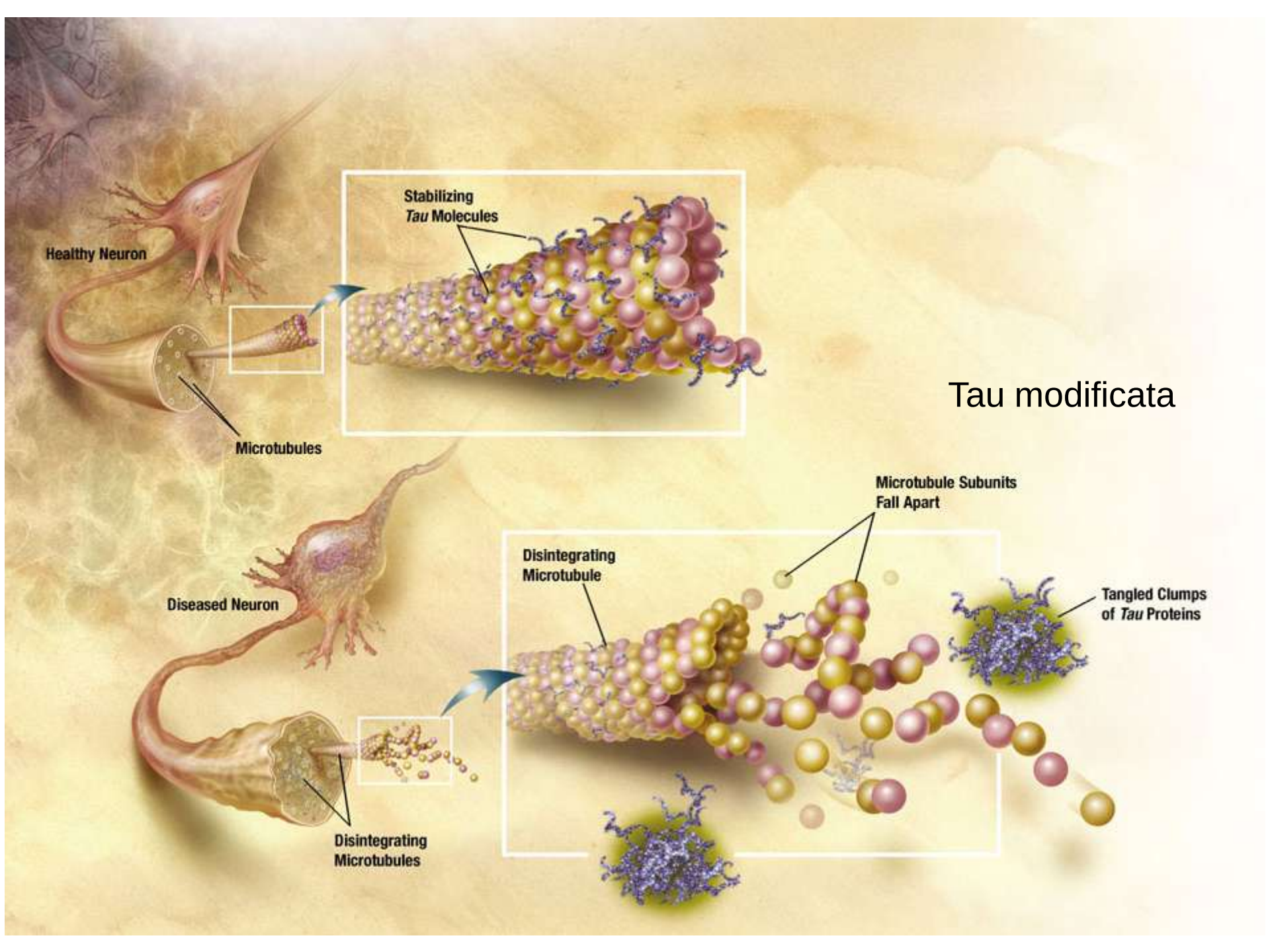
Disintegrating
Microtubule

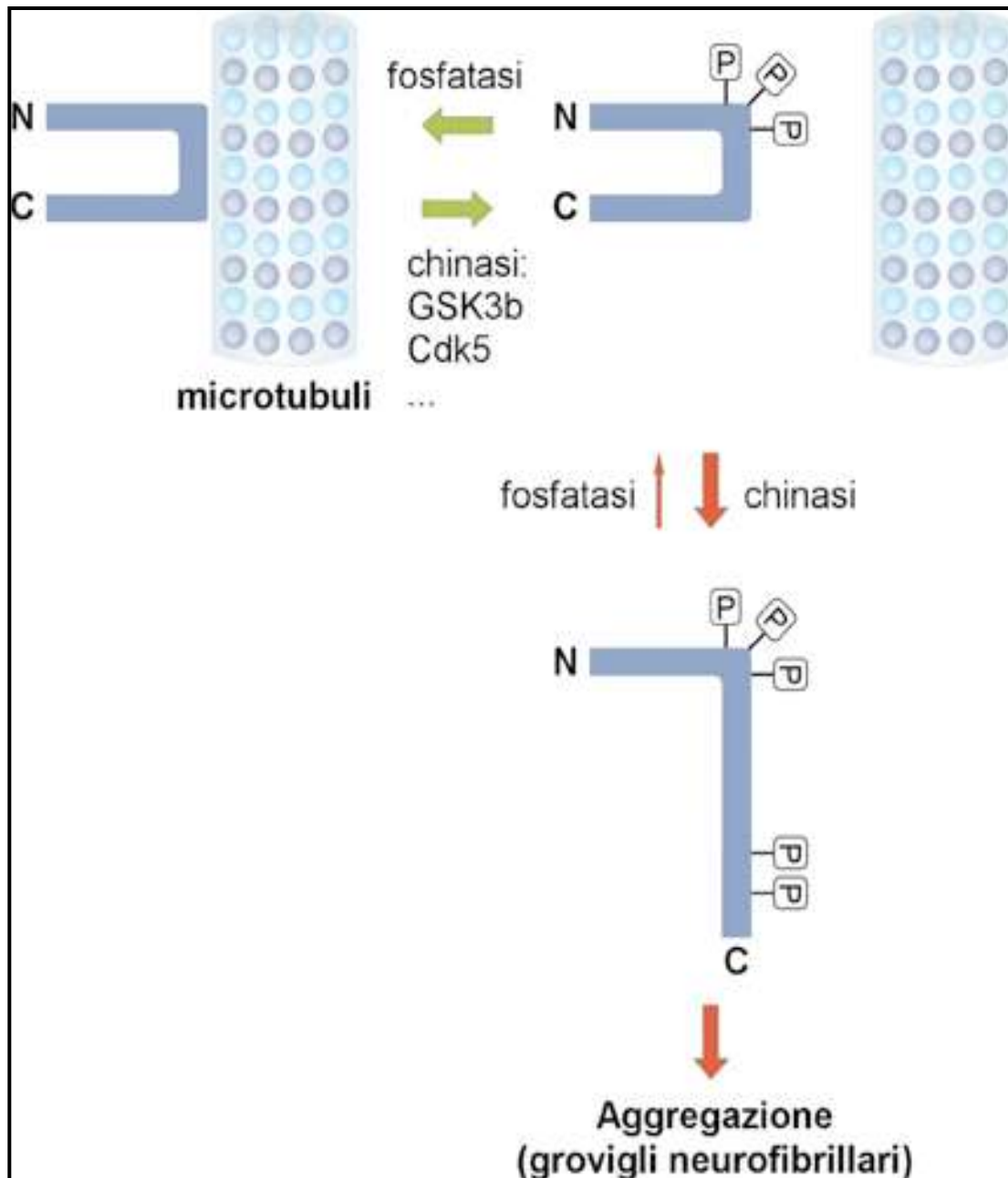
Microtubule Subunits
Fall Apart

Tangled Clumps
of *Tau* Proteins

Disintegrating
Microtubules

Tau modificata





Modello di fosforilazione ed aggregazione di tau.

La proteina tau promuove l'assemblaggio e la stabilizzazione dei microtubuli.

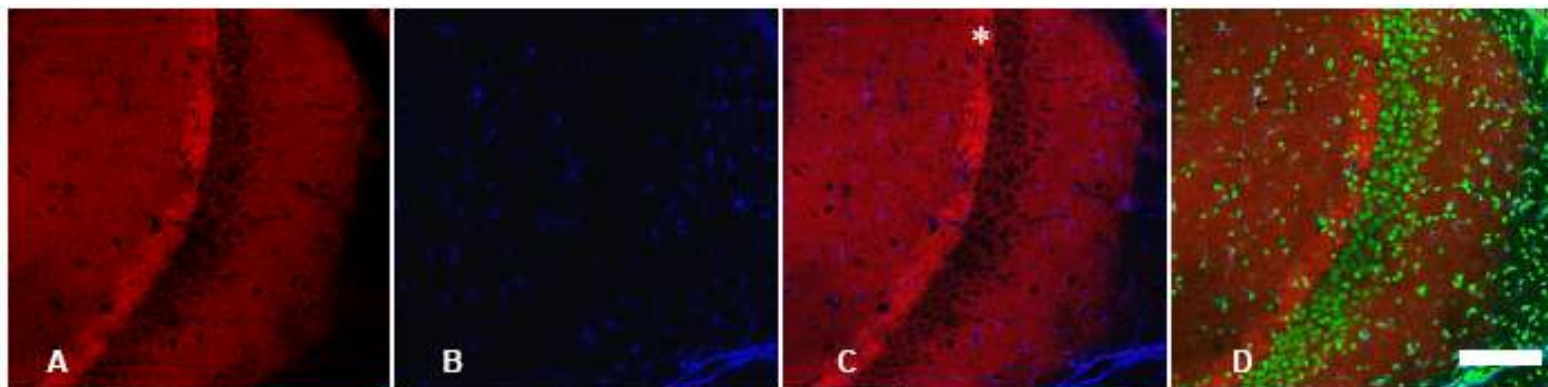
La sua fosforilazione da parte di alcune **protein-chinasi** determina il suo distacco dai microtubuli. Ulteriori eventi di fosforilazione (o la mancata defosforilazione) causano un cambiamento conformazionale che induce l'aggregazione e la formazione dei grovigli neurofibrillari.

GFAP

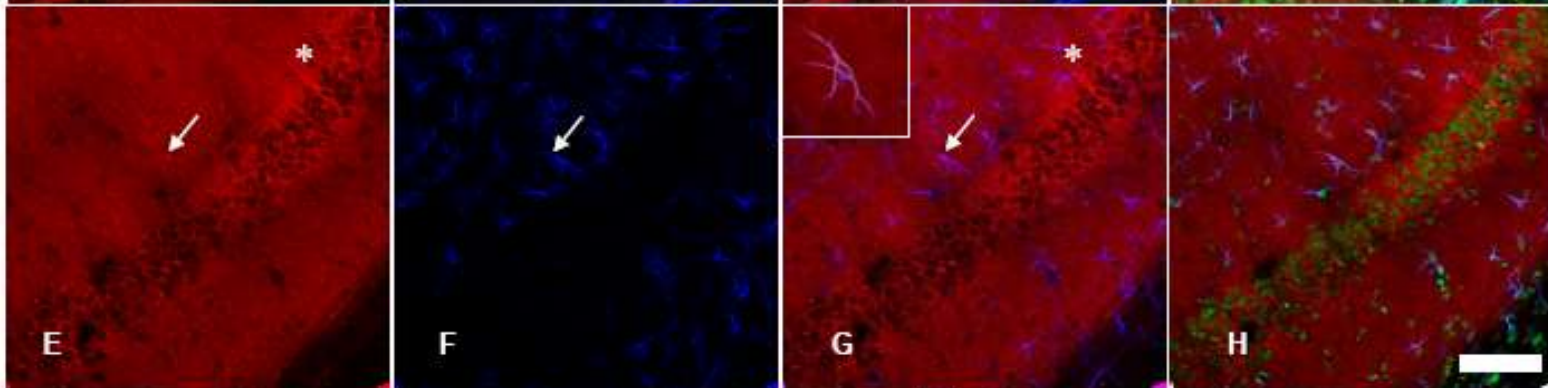
PP2B

Nissl stain

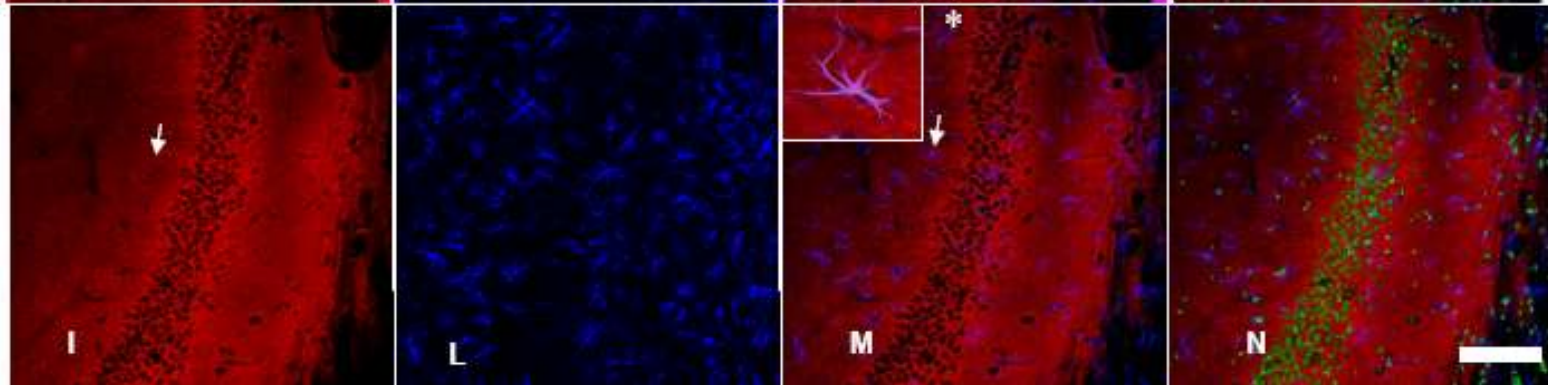
WT



hAChE



2Xtg



Hippocampus (green, Nissl stain; blue, GFAP; red, PP2B).

3. Presenza di depositi proteici *extracellulari*

Placche senili



Depositi sferici di materiale amorfo, il cui nucleo è costituito dalla **proteina amiloide**, circondata da assoni distrofici e da cellule infiammatorie.

APP (proteina precursore dell'amiloide)

Proteina sintetizzata nel Reticolo Endoplasmatico Ruvido, glicosilata nell'apparato del Golgi e trasportata alla superficie dei neuroni, dove diviene una **proteina intrinseca di membrana**

- grande dominio extracellulare N-terminale.
- un'elica transmembrana
- un corto dominio citosolico C-terminale

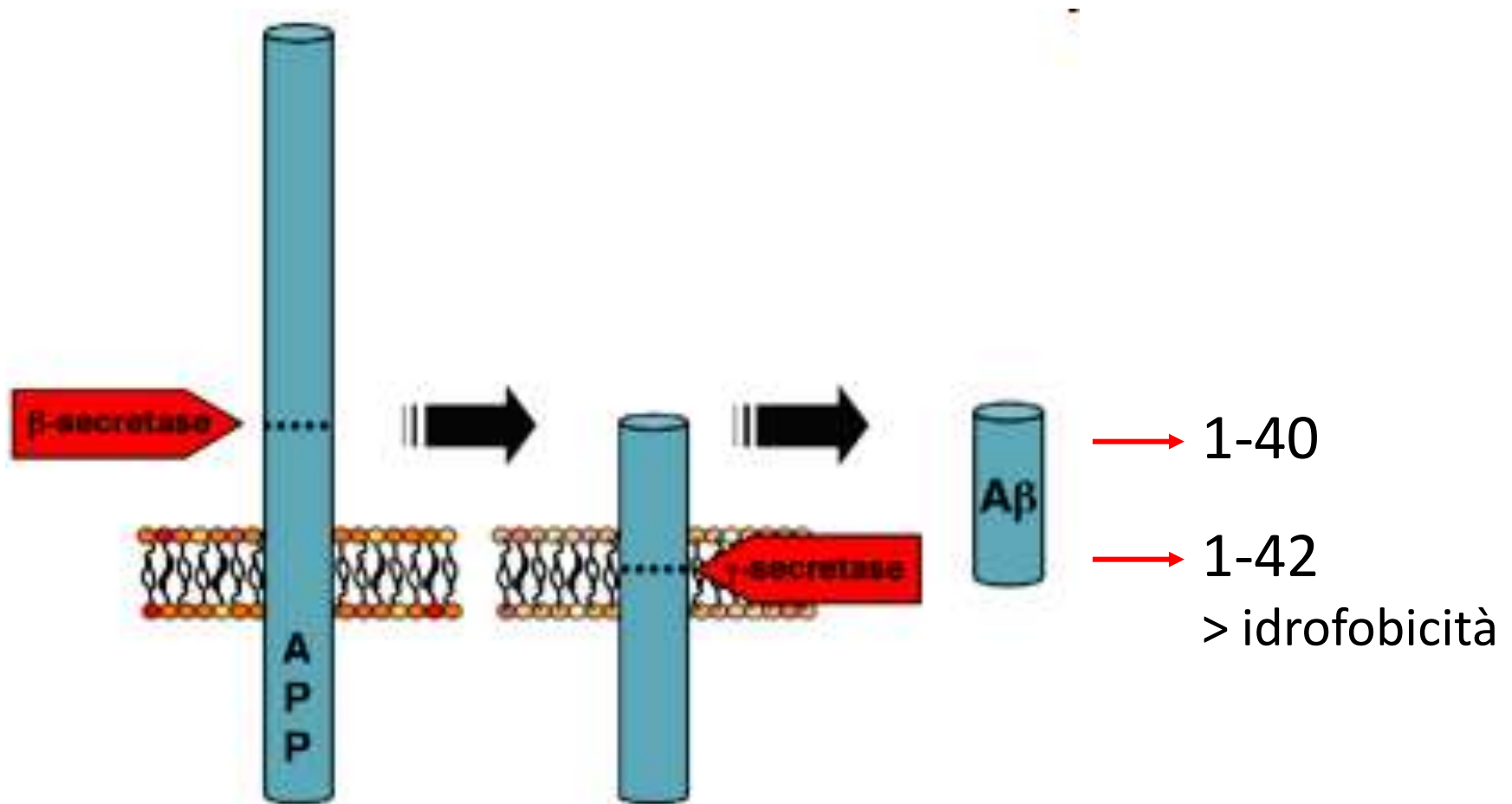
Esiste in tre principali isoforme (695, 751, 770 aa), ciascuna delle quali contiene l'amiloide A β

E' presente nei dendriti, nei corpi cellulari e negli assoni dei neuroni (ma anche in molti altri tipi di cellule). Non è ancora nota la sua funzione.

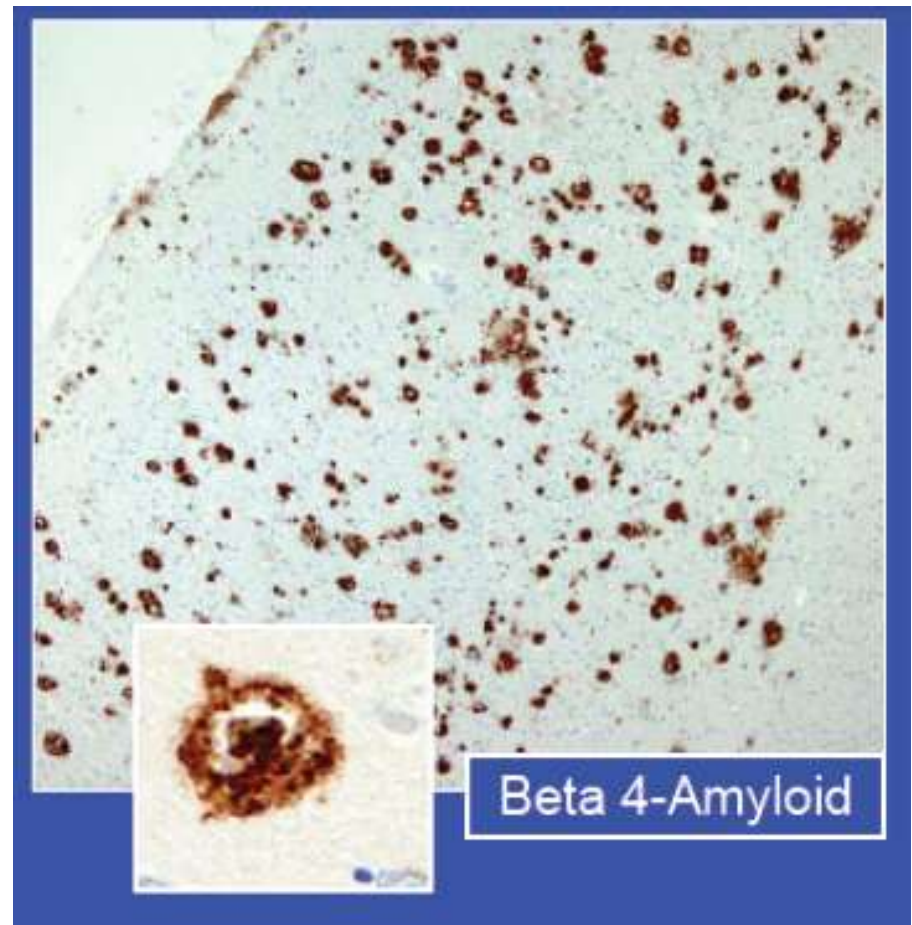
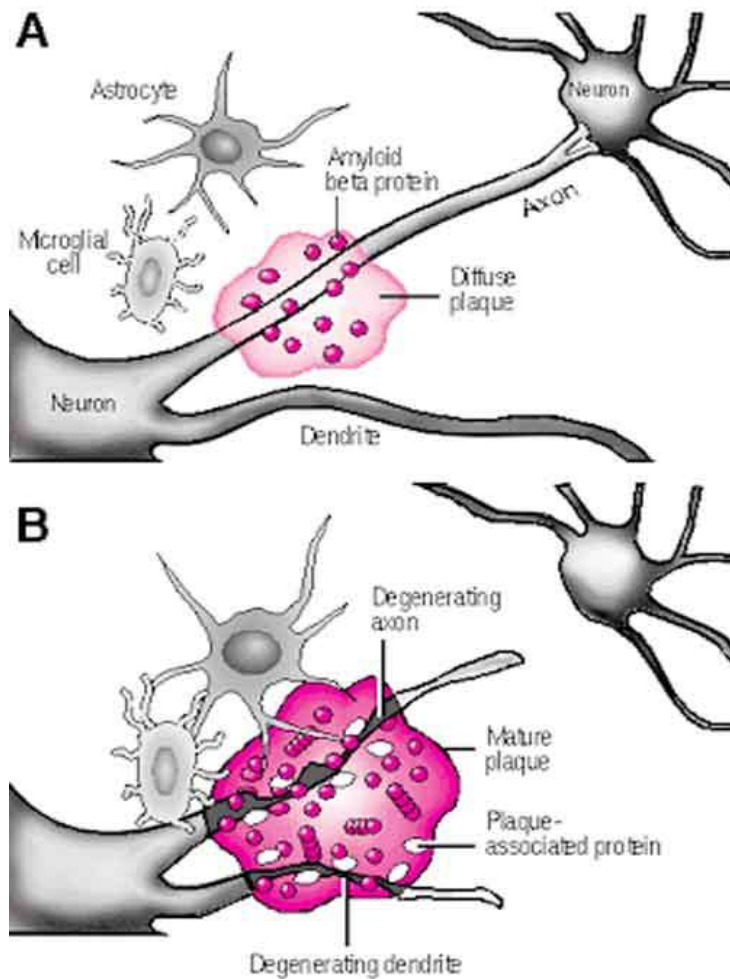
Experimental models for AD

- **Recombinant mutant proteins, synthetic A β peptide**
easy to handle in vitro
“artificial chemical environment”
- **Cell lines treated with A β peptide (mouse, human)**
easy to handle in vitro
cell-to-cell signals are lost
- **Transgenic mice (mutant APP, tau, PS1)**
cell-to-cell signals are maintained; therapy modelling
only a few aspects of AD are reproduced in each strain

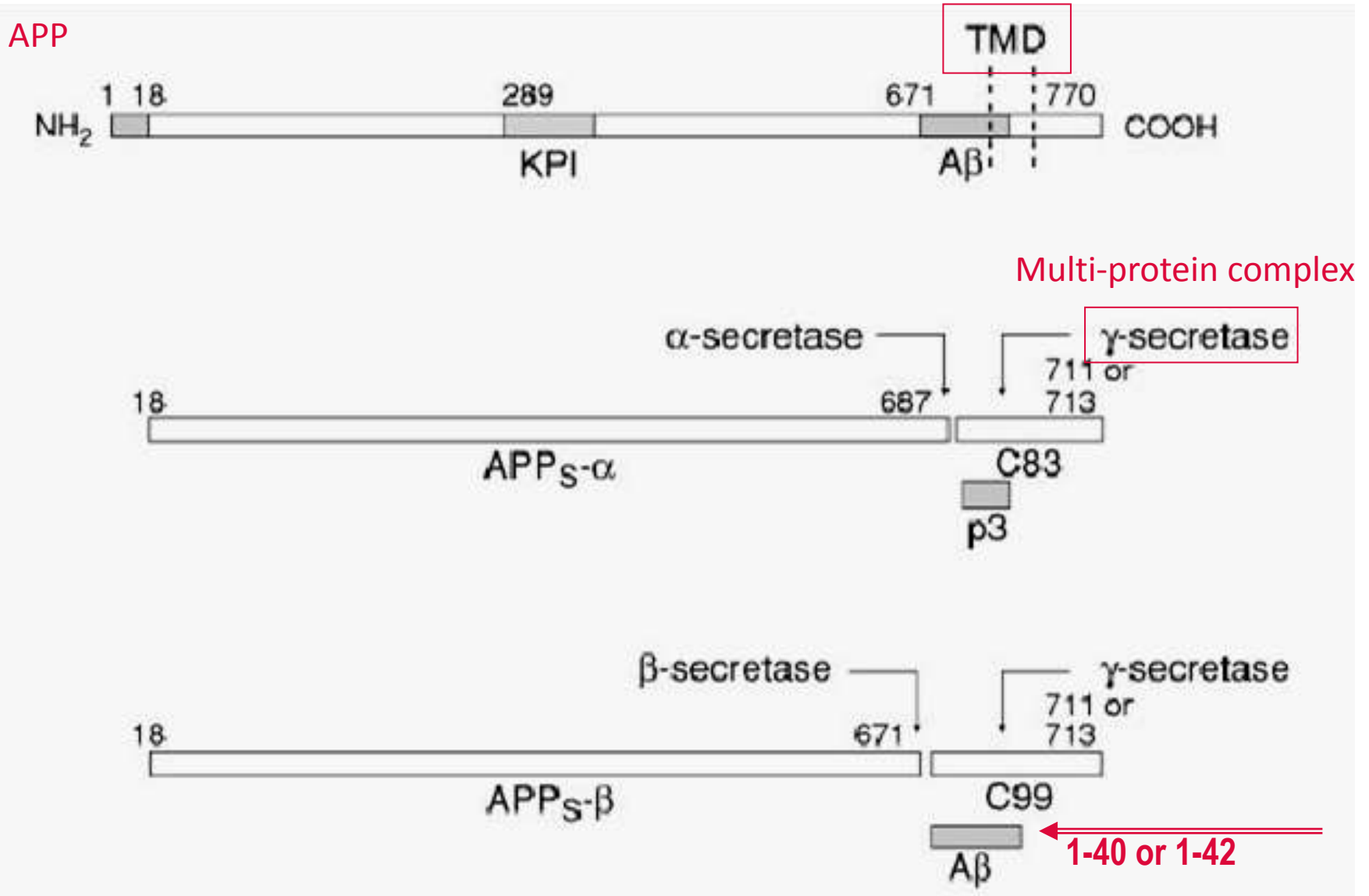
Il processamento post-traduzionale di APP produce il peptide A β



Quando il rapporto $A\beta$ 1-42 : $A\beta$ 1-40 è alterato, il peptide $A\beta$ 1-42 si aggrega nelle placche amiloidi (anziani e pazienti con morbo di Alzheimer)



LA MATURAZIONE PROTEOLITICA DI APP



Aβ is constitutively released from APP and secreted by mammalian cells throughout life and thus occur **normally** in plasma and (CSF)

LA MATURAZIONE PROTEOLITICA DI APP

Il **primo taglio** può essere effettuato da

α -secretasi o **β -secretasi**

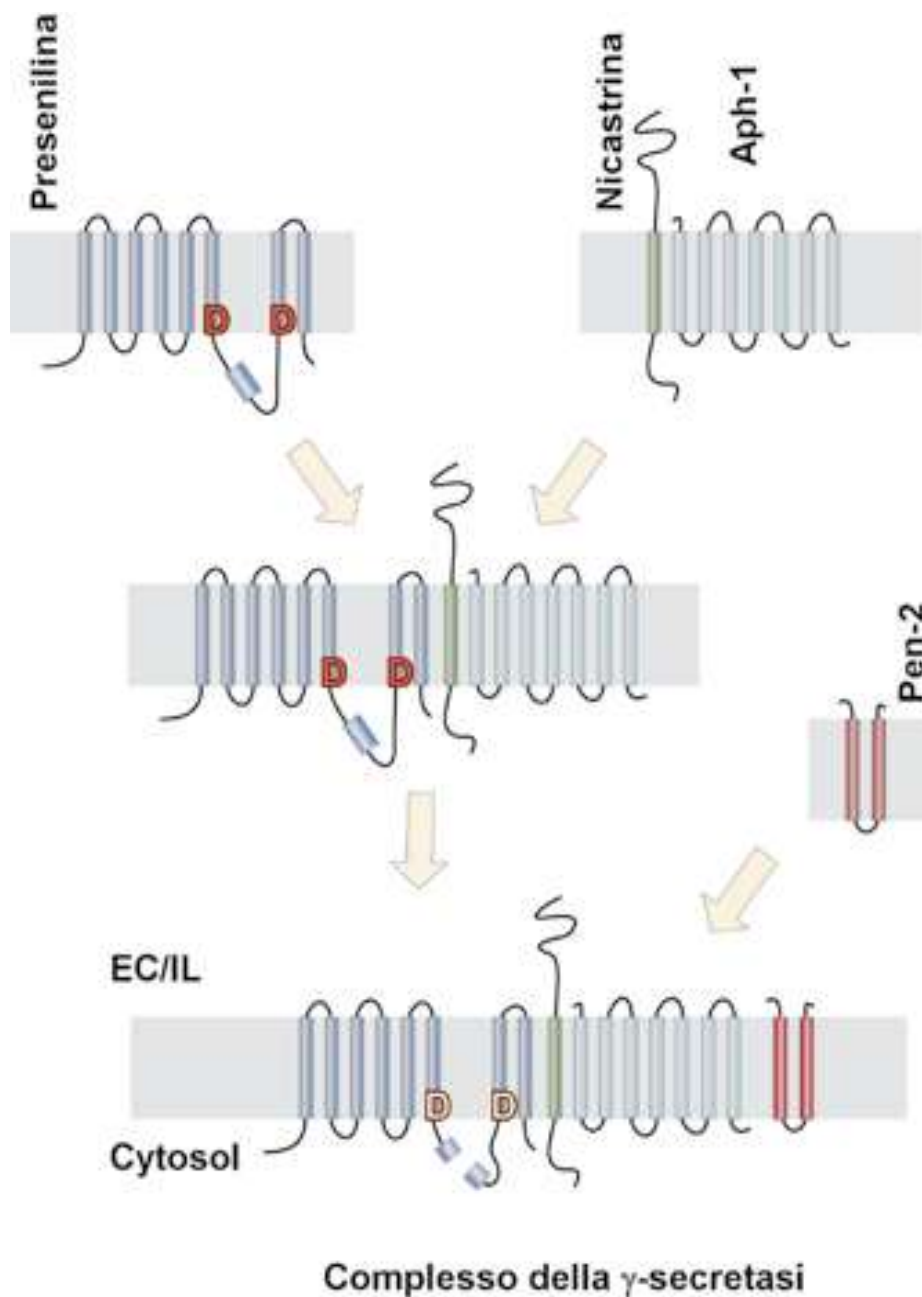
→ rilascio nell'ambiente extracellulare di tutto il dominio **N-terminale di APP** (forma solubile).

Il **secondo taglio** è invece sempre catalizzato da **γ -secretasi**

→ frammento **C-terminale** di 57-59 residui **AICD (APP intracellular domain)** rilasciato all'interno della cellula + frammento **N-terminale** la cui dimensione varia a seconda di quale secretasi ha effettuato il **primo taglio** e del sito di taglio da parte della γ -secretasi:

α -secretasi e **γ -secretasi** si genera un peptide **p3** **non amiloidogenico**

α -secretasi e **β -secretasi** si genera il **peptide β amiloide- $A\beta$** di 40 o 42 aminoacidi a seconda del sito di taglio da parte di γ -secretasi.



Il complesso della γ -secretasi

(Almeno) quattro proteine, una delle due preseniline (PS1 o PS2), Aph1, Pen-2 e nicastrina.

1. Le **preseniline** sono proteine con otto tratti transmembrana che formano un primo complesso con altre due proteine di membrana, **nicastrina** ed **Aph-1**.
2. Successivamente si associa una proteina con due tratti transmembrana, **Pen-2**, per formare un complesso con 18 alfa-eliche transmembrana.
3. In questa struttura la presenilina è tagliata in punto specifico tra il sesto ed il settimo tratto transmembrana da una presenilinasia sconosciuta. In questa forma il complesso ha **attività γ -secretasica *in vitro***.

Le secretasi sono possibili bersagli farmacologici

α -secretasi taglia APP tra una Lys ed una Leu contenute all'interno del peptide A β e quindi preclude la generazione del peptide A β .

- Una perdita di funzione α -secretasica (associata all'invecchiamento ?) potrebbe favorire la formazione amiloidogenica.

β -secretasi o **BACE-1** (β -site APP cleaving enzyme-1) aspartil proteasi, simili alla famiglia della pepsina, associata alla membrana plasmatica, attraverso un tratto transmembrana.

- Topi KO per BACE-1 si sviluppano normalmente e quindi questo enzima è da considerarsi un eccellente bersaglio per inibitori specifici che, prevenendo la formazione del peptide β -amiloide, potrebbero essere adoperati come farmaci.

γ -secretasi rappresenta un bersaglio ideale per farmaci che inibendone l'attività potrebbero ridurre il taglio di APP e la produzione di A β .

- Il complesso della γ -secretasi ha numerosi altri substrati oltre al frammento C-terminale di APP (Notch, N- ed E-caderina, LRP, Syndecan, Delta, CD44, ErbB4 e Nectin1 α) → Il KO di entrambe le preseniline determina gravissime alterazioni incompatibili con la vita.

- Pertanto, nonostante siano stati sviluppati inibitori specifici di γ -secretasi con buone caratteristiche farmacologiche, sono stati sollevati molti dubbi sul loro possibile uso nell'uomo.

La neurotossicità dei peptidi A β

Gli aggregati oligomerici di A β (**A β -42**) sono **tossici** per i neuroni, determinandone la morte, attraverso meccanismi, non ancora chiariti. Tra le ipotesi :

- alterazione **dell'omeostasi del calcio** e generazione di **ossido nitrico e perossido nitrico**
- generazione di **radicali liberi** attraverso il coinvolgimento di metalli come rame e zinco
- **attivazione** della **microglia** e liberazione di **citochine neurotossiche**
- rilascio di aminoacidi eccitatori come il **glutammato** → **eccitotossicità**
- disturbo del **trasporto assonale**

MA : Gli oligomeri determinano danni ben **prima** che si manifesti la loro aggregazione sotto forma di placche senili, la cui abbondanza, per altro, non è per nulla correlata con la severità della neurodegenerazione.

AGGREGAZIONE

L'aggregazione delle fibrille di amiloide è favorita da

concentrazione proteica

tempo (l'invecchiamento è un fattore favorente)

mutazioni predisponenti al misfolding

condizioni ambientali (pH, presenza di ioni, ecc.)

RIMOZIONE di A β

Meccanismi deputati a prevenire la formazione di aggregati proteici

- Degradazione **lisosomiale**, mediata da LDL-receptor related protein (LRP)
- Trasferimento dei **peptidi A β** è dall'ambiente extracellulare al **plasma e CSF** superando la BEE attraverso un meccanismo LRP-dipendente
- Nell'**ambiente extracellulare** la degradazione avviene invece ad opera di due **metallo-endopeptidasi extracellulari**
IDE (insulin degrading enzyme) degrada molte proteine come insulina, glucagone etc
Neprilisina, proteina di membrana che idrolizza peptidi extracellulari

Entrambi questi enzimi rappresentano interessanti candidati per il trattamento dell'AD.

IL FUTURO DELLA TERAPIA PER LA MALATTIA DI ALZHEIMER

- Inibitori β -secretasi (BACE)
- Inibitori γ -secretasi
- Farmaci che stimolano α -secretasi
- Rimozione diretta A β 42 (IDE-Neprilisina)
- Immunoterapia (immunizzazione contro β -amiloide)

FANS: modulano γ -secretasi (pochi dati sulla loro efficacia)

Non solo A β

FATTORI GENETICI DI RISCHIO

1. Mutazione del gene **APP** (+ trisomia 21)
2. Mutazione del gene della **presenilina 1**
3. Mutazioni del gene della **presenilina 2**
4. Varianti alleliche di **ApoE**
5. Mutazione o polimorfismo del gene che codifica la **macroglobulina alfa-2 (?)**

Una delle prime 3 mutazioni si associa ad esordio precoce (III-VI decade di età)

Alleli specifici di ApoE o alterazioni della macroglobulina alfa-2 predispongono ad un inizio precoce della forma sporadica o inizio tardivo della forma familiare.

** Presenilina 1 e 2 (PS1 e PS2) sono coinvolte nella maturazione proteolitica di APP*

Contributo di alterazioni geniche ?

La tossicità della PS1 mutante è associata a produzione di superossido, depolarizzazione mitocondriale e attivazione di caspasi.

L'attività pro-apoptotica della PS1 è mediata da una aberrante regolazione di NF- κ B (fattore di trascrizione redox sensibile) che rende i neuroni vulnerabili all'apoptosi.

Colesterolo e malattia di Alzheimer

Alti livelli di **colesterolo** sono associati ad un **aumentato rischio** di AD.

Inibitori della biosintesi del colesterolo (**statine**) diminuiscono la quantità di A β prodotta dalle cellule in coltura e studi retrospettivi suggeriscono che pazienti ipercolesterolemici, che assumono per anni queste statine, hanno una minore incidenza di AD.

Allele $\epsilon 4$ del gene Apo E

- Eterozigoti per $\epsilon 4$ hanno un rischio di manifestare la malattia tre volte maggiore degli omozigoti per l'allele $\epsilon 3$
- Omozigoti $\epsilon 4$ hanno un rischio 15 volte maggiore.
- **L'allele $\epsilon 4$ del gene ApoE** è associato ad una più precoce insorgenza della malattia.

ApoE è una glicoproteina responsabile dell'omeostasi del **colesterolo**, i cui livelli plasmatici hanno un ruolo importante nell'accumulo di $A\beta$.

Oxidative damage markers found in Alzheimer's Disease brain

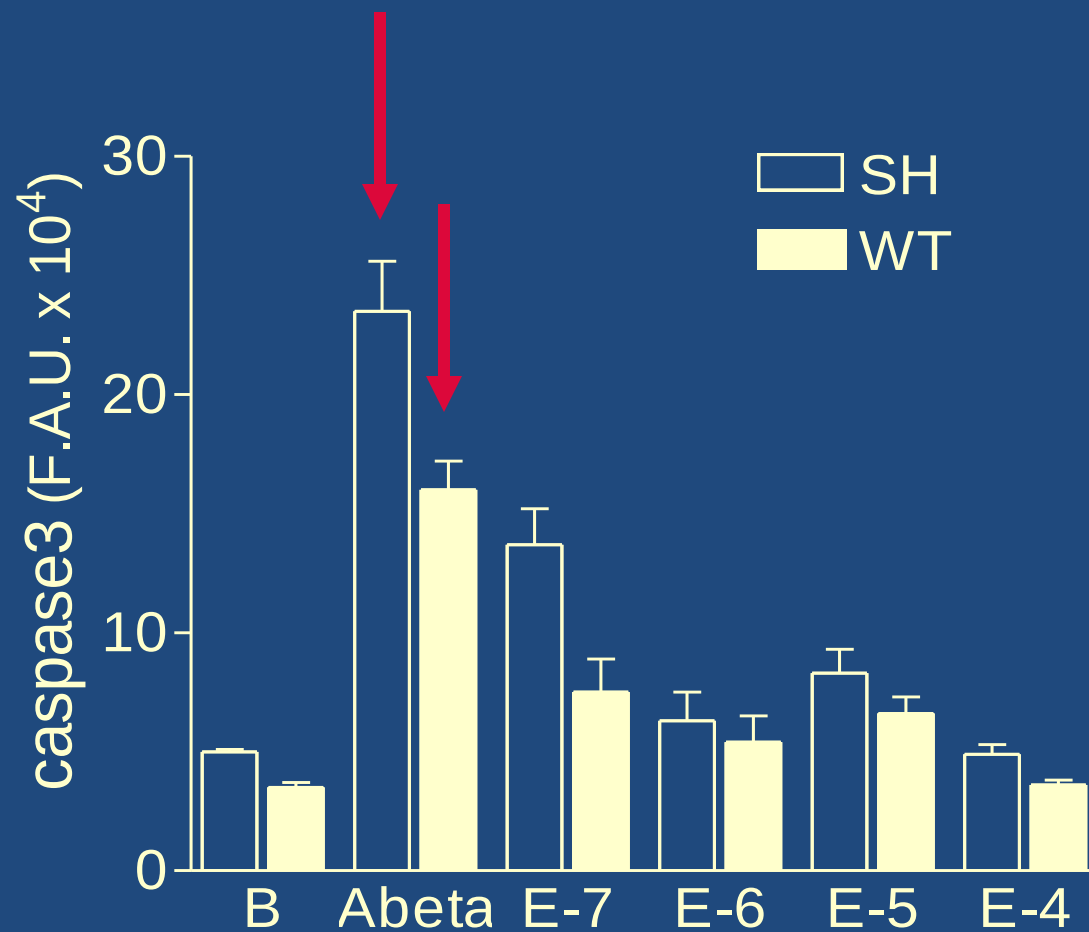
Oxidative damage markers found in AD brain :

- > Free protein carbonyls
- > Lipid peroxidation adducts
- > Mitochondrial DNA oxidation adducts
- > Nuclear DNA oxidation adducts
- > Cytoplasmatic RNA oxidation adducts
- > Protein nitration
- > Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity
- > Heme oxygenase-1 levels

Sbilanciamento della difesa antiossidante ?

I pazienti AD hanno alterazioni plasmatiche :

- minore Vit. E (e anche minore glutathione transferasi nel cervello e nel liquido ventricolare);
- pazienti che assumono Vit. E o Vit. C hanno una incidenza ridotta (su 633 persone > 65 anni);

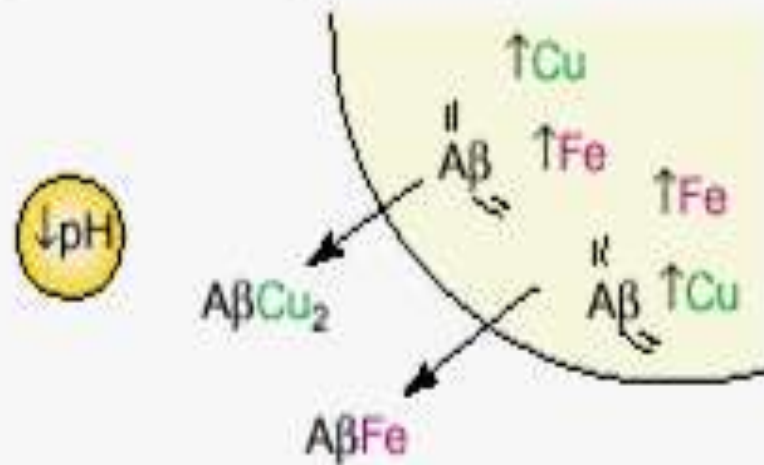


E-7 = 17- β estradiolo 10⁻⁷ M

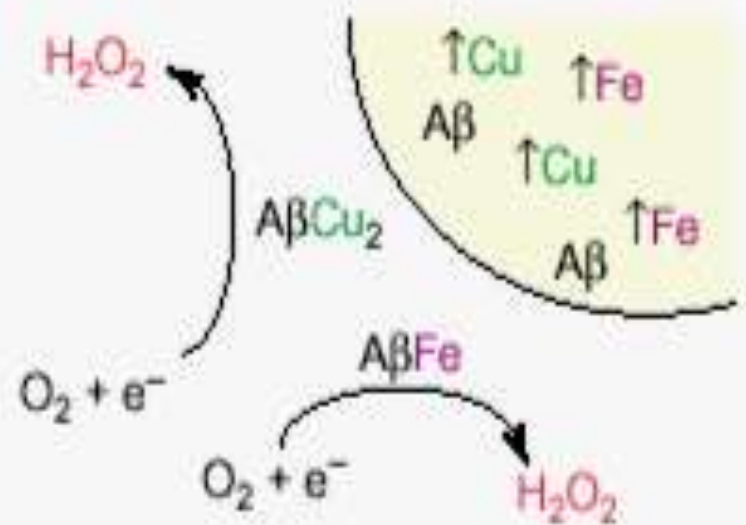
Il peptide amiloide β ($A\beta$) potrebbe rappresentare **l'anello di congiunzione** tra lo stress ossidativo e la morte neuronale nell'AD.

L'aggregazione del β -amiloide è favorita in condizioni di stress ossidativo e potrebbe essere dipendente da metalli.

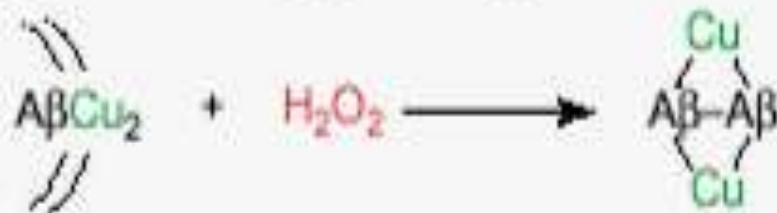
(1) A β becomes hypermetallated



(2) A β produces H₂O₂



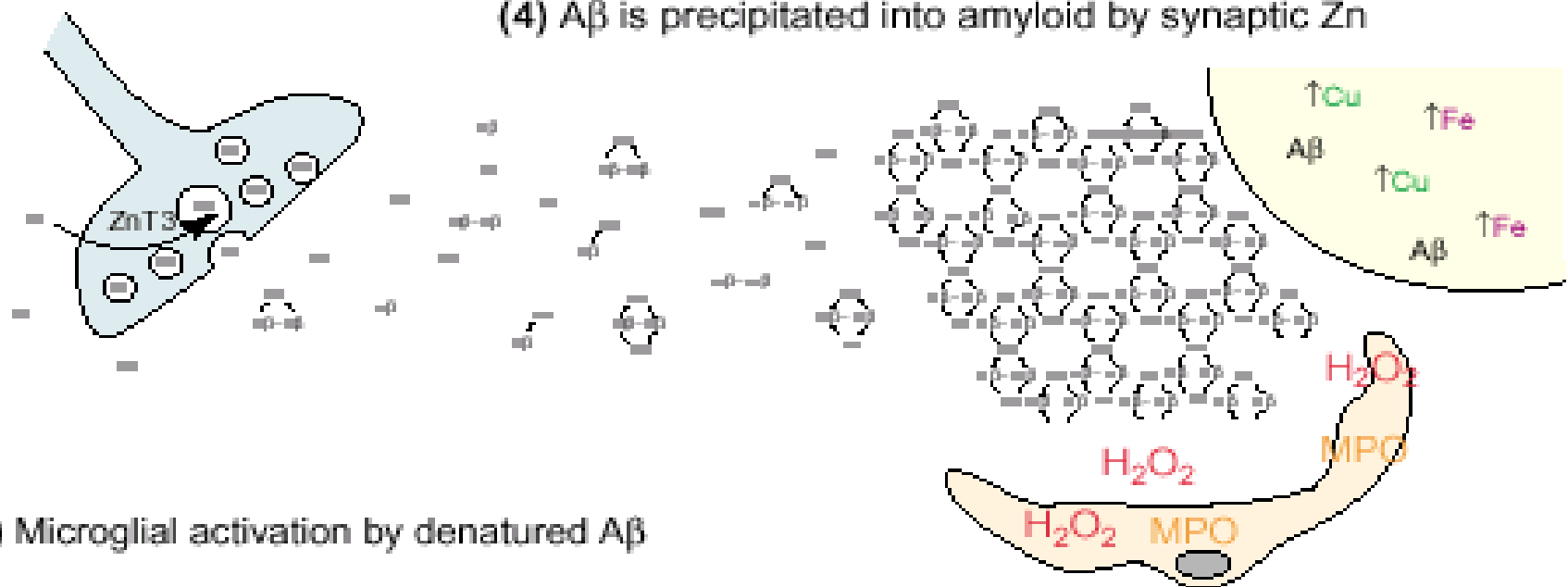
(3) H₂O₂ oxidizes A β , generating soluble and crosslinked A β forms



Da : Bush A.I. (2003)

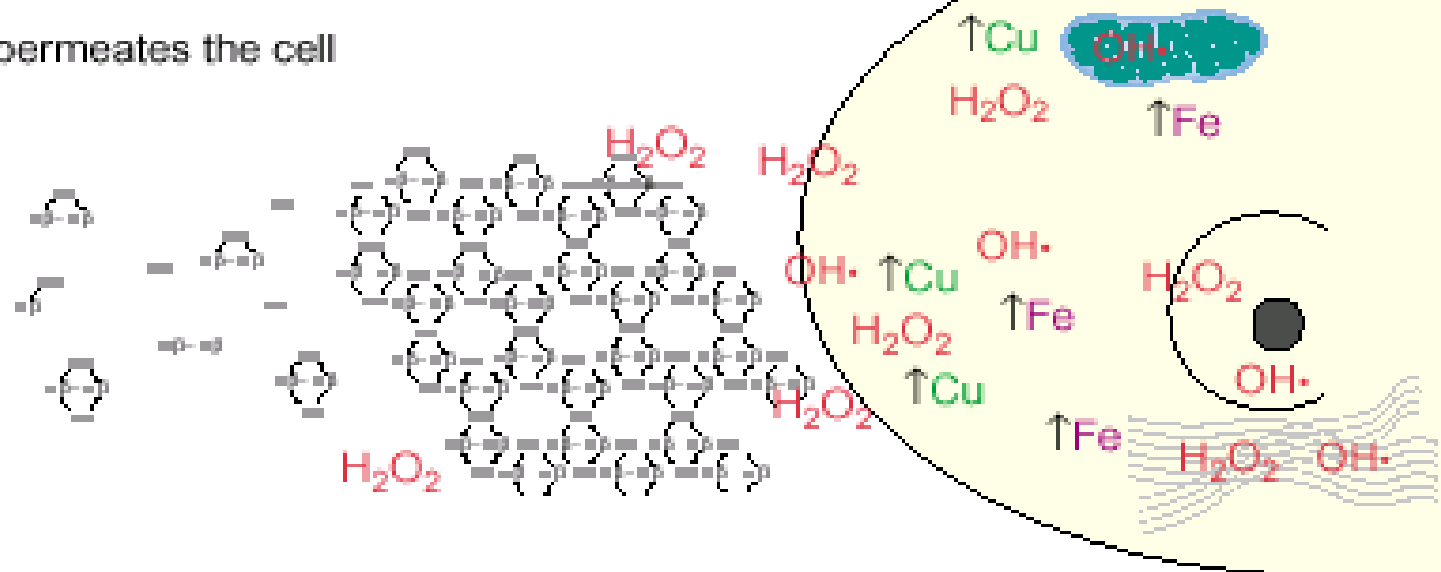
Trends in Neurosciences **26**, 207-214

(4) A β is precipitated into amyloid by synaptic Zn



(5) Microglial activation by denatured A β

(6) H₂O₂ permeates the cell



Contributo di fenomeni di eccitotossicità ?

- Gli inibitori della NO-sintasi diminuiscono gli effetti neurotossici dello stress ossidativo
- In pazienti AD si osserva un deficit colinergico (inibitori della colinesterasi sono efficaci)
- I trasportatori del glutamato sono sensibili a stress ossidativo

Contributo di fattori ambientali ?

Fattori protettivi

uso di farmaci anti-infiammatori
terapia sostitutiva con estrogeni
alto grado di scolarizzazione

Fattori di rischio

età
storia familiare di demenza
alcuni genotipi
sindrome di Down
appartenenza ad alcuni gruppi etnici
trauma cranico



esposizione occupazionale a metalli

Contributo dei metalli ?

Oltre ad una serie di **controversi dati** sulla presenza di metalli in associazione con le lesioni tipiche dell'AD, il coinvolgimento dei metalli nella patogenesi dell'AD è indicato anche dalla osservazione che negli stadi iniziali si osserva un **aumento della espressione di metallothioneine** (MT I e MT II), una classe di proteine che rappresenta uno dei principali meccanismi di risposta ad alterazioni delle concentrazioni intracellulari di metalli pesanti.

Alluminio

1. Sali di Al iniettati inducono formazione di fasci neurofibrillari
2. Al è presente nelle placche e in neuroni con fasci neurofibrillari di pazienti
3. Studi epidemiologici indicano un legame tra incidenza di AD e concentrazione di Al nell'acqua potabile
4. Il trattamento con desferroxamina (un potente chelante di Al) induce un ritardo della progressione del morbo.

Una esposizione eccessiva ad alluminio potrebbe derivare da

- effetto solubilizzante di piogge acide
- cottura in recipienti di alluminio
- processi di potabilizzazione dell'acqua.

Ferro

1. La concentrazione di ferro in materiale autoptico da cervelli di pazienti AD è maggiore che in controlli.
2. I pazienti mostrano segni di un metabolismo alterato del Fe ed in particolare una alterata distribuzione del Fe in diverse regioni cerebrali, che è forse connessa a modificazioni delle proteine di regolazione. La Iron Regulatory Protein IRP2 è associata con lesioni intraneuronali.
3. Il ferro potenzia la capacità del peptide A β di produrre ROS.
4. La variante genetica TFC2 della transferrina è frequentemente associata ad AD.

Zinco

1. La concentrazione di zinco è maggiore selettivamente nell'ippocampo e nell'amigdala di pazienti AD rispetto ai controlli.
2. Una aumentata concentrazione di zinco induce l'aggregazione di $A\beta$, un effetto che è revertito dalla contemporanea presenza di ApoE, ma non della sua variante "tossica" epsilon4.
3. Fattori di trascrizione zinco-dipendenti (ad es. Sp1) legano il promotore di APP.

Mercurio

La presenza di alterazioni nella presenza di Hg nel SNC di pazienti AD è fortemente dibattuta.

Alcuni autori riferiscono di un raddoppio nella concentrazione ematica di Hg, non accompagnato da alterazioni urinarie. Studi epidemiologici non sono riusciti a rilevare correlazioni fra l'incidenza di AD e alcuni fattori ambientali che potrebbero indurre una elevata concentrazione di Hg. Fra questi :

- assunzione di pesce e crostacei,
- presenza di amalgame di mercurio in otturazioni dentarie,
- esposizione occupazionale a vapori di Hg.

La distribuzione geografica non omogenea dell'incidenza di AD potrebbe essere legata a **differenze regionali** in vari fattori

1. Diverso **background genetico**
2. Disomogenea **distribuzione delle piogge acide**
3. Diverso **stile di vita** (dieta e consumo di pesce; utilizzazione di utensili di alluminio; potabilizzazione delle acque; utilizzazione di materiali dentari)
4. Diversa **esposizione alla luce**: possibile danno mediato da melatonina e metalli nelle popolazioni esposte ad un maggiore numero di ore di luce elettrica

Alzheimer's Disease Pathways

