

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE



TESI DI LAUREA

**ESPRESSIONE DEL RECETTORE PER IL FATTORE
DI CRESCITA INSULINO-SIMILE DI TIPO 1 (IGF1-R)
IN NEURONI CORTICALI PRIMARI
DURANTE L'INVECCHIAMENTO E IMPLICAZIONI
NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER**

*Relatore: Prof.ssa Paola Irato
Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di Padova*

*Correlatore: Dott.ssa Vittorina Della Bianca
Dipartimento di Patologia e Diagnostica
Sezione di Patologia Generale
Università degli Studi di Verona*

Laureanda: Monica Delegà

Anno Accademico 2009/2010

*Ai miei genitori
faro nella mia vita*

*a Emanuele
presente e futuro
dei miei orizzonti*

INDICE

ABBREVIAZIONI	5
1 INTRODUZIONE	7
1.1 Malattia di Alzheimer: alterazioni macroscopiche	7
1.2 Malattia di Alzheimer: alterazioni microscopiche	8
1.2.1 <i>Placche neuritiche</i>	8
1.2.2 <i>Grovigli neurofibrillari</i>	9
1.3 Forme cliniche	10
2 PATOGENESI	13
2.1 Ipotesi della β -amiloide	13
2.2 Formazione, degradazione e rimozione dei peptidi di β -amiloide	13
2.3 Principali forme di β -amiloide	15
2.4 Meccanismi con cui la β -amiloide produce danni neuronali e funzionali	16
2.5 Critiche all'ipotesi della cascata della β -amiloide	16

3	RECETTORE PER IL FATTORE DI CRESCITA INSULINO-SIMILE DI TIPO 1 (IGF1-R)	19
3.1	IGF1-R e suo sistema di signaling	19
3.2	IGF1 e suo recettore nel cervello	22
3.3	IGF1-R e malattia di Alzheimer	23
3.4	La via di signaling insulina/IGF1 regola la longevità	25
3.5	IGF1-R modula la produzione di A β nel cervello durante l'invecchiamento	28
4	SCOPO DELLA TESI	31
5	MATERIALI E METODI	33
5.1	Culture di neuroni corticali primari di ratto	33
5.2	Culture di neuroni corticali primari puri	34
5.3	Culture di astrociti corticali primari	34
5.4	Trattamenti delle colture neuronali	34
5.5	Co-culture di neuroni e astrociti	36
5.6	Immunocitochimica	36
5.7	Preparazione di lisati cellulari	37
5.8	Western Blot	37
5.9	Analisi statistica	39

6	RISULTATI	41
6.1	Espressione di IGF1-R nelle colture neuronali primarie di ratto durante la senescenza <i>in vitro</i>	41
6.2	Localizzazione di IGF1-R nelle colture neuronali a lungo termine	46
6.3	Ruolo degli astrociti nella regolazione dell'espressione di IGF1-R nei neuroni	52
6.4	I mediatori del cross-talk tra neuroni e astrociti	56
7	DISCUSSIONE	59
8	CONCLUSIONI	65
	BIBLIOGRAFIA	67
	<i>Ringraziamenti</i>	75

ABBREVIAZIONI

A β	<i>peptide beta-amiloide</i>
ACM	<i>astrocyte conditioned medium</i>
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
Akt	<i>serine-threonine protein kinase</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
Ara-C	<i>cytosine arabinoside</i>
Cdk-5	<i>cyclin-dependent kinase-5</i>
CM	<i>conditioned medium</i>
DAF-2	<i>gene encodes an insulin-like receptor</i>
FAD	<i>familiar Alzheimer's disease</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
GSK-3 β	<i>glycogen synthase kinase 3β</i>
IDE	<i>insulin degrading enzyme</i>
IGF-1/2	<i>insulin-like growth factor 1/2</i>
IGF1-R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>

IGFBP	<i>IGF binding protein</i>
IR	<i>insulin receptor</i>
IRS-1/2	<i>insulin receptor substrate</i>
LRP-1	<i>LDL receptor-related protein-1</i>
MAP	<i>microtubule-associated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
NEP	<i>neutral endopeptidase</i>
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i>
nSMase	<i>sphingomyelin phosphodiesterase</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PHF	<i>paired helical filaments</i>
PI3K	<i>phosphatidyl inositol 3-kinase</i>
PIP2	<i>fosfatidil inositolo 4,5-bisfosfato</i>
PIP3	<i>fosfatidil inositolo 3,4,5-trisfosfato</i>
PS-1/2	<i>presenilina-1/2</i>
p75 ^{NTR}	<i>receptor for neurotrophin</i>
Trk	<i>receptor tyrosine kinase</i>
UNC	<i>unconditioned neurobasal medium</i>

INTRODUZIONE

La malattia di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa progressiva caratterizzata dalla perdita di funzione e morte delle cellule neuronali in diverse aree del cervello che porta alla perdita della funzione cognitiva.

Gli aspetti neurobiologici che caratterizzano questa malattia consistono in alterazioni macroscopiche e microscopiche.

1.1 Malattia di Alzheimer: alterazioni macroscopiche

La caratteristica macroscopica più evidente del cervello di un soggetto affetto da malattia di Alzheimer è la marcata atrofia che determina un' aumentata ampiezza dei solchi cerebrali e l' incremento del volume ventricolare, come illustrato in *Fig. 1b*.

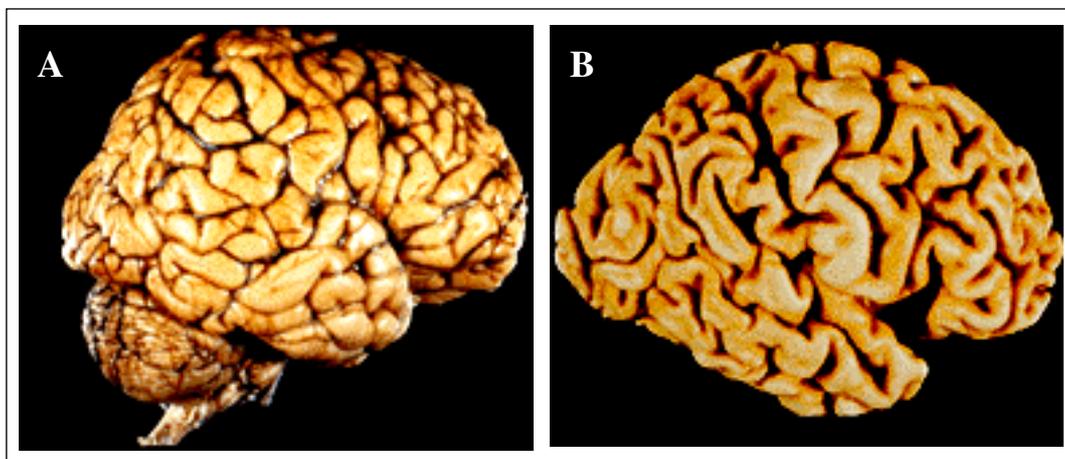


Fig. 1 - A: Cervello invecchiato di paziente sano; B: Cervello di paziente affetto da malattia di Alzheimer.

Questa atrofia appare diffusa, interessando, oltre al lobo temporale, le aree associative corticali, l'ippocampo ed il giro para-ippocampale, con un relativo risparmio delle aree posteriori degli emisferi, del cervelletto e del tronco cerebrale.

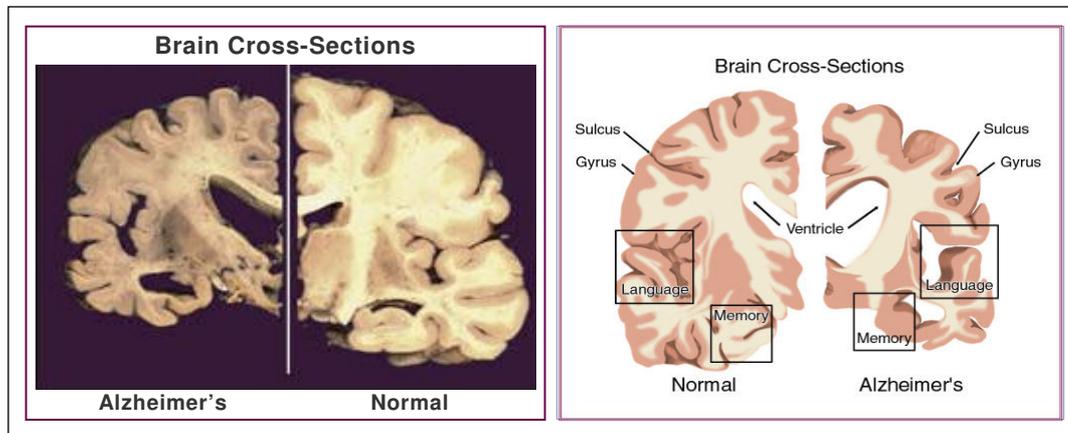


Fig. 2 - Sezioni frontali del cervello, strutture subcorticali. Allargamento compensatorio dei ventricoli.

L'atrofia è legata principalmente alla degenerazione neuronale, che comporta riduzione del numero di spine dendritiche e di giunzioni sinaptiche, fino ad una vera e propria scomparsa della cellula nervosa, fenomeno questo che si determinerebbe con un meccanismo apoptotico.

Fra le strutture sottocorticali, particolarmente colpite dalle interazioni degenerative sono l'amigdala, il locus coeruleus, il nucleo del rafe e le strutture colinergiche del tronco cerebrale.

1.2 Malattia di Alzheimer: alterazioni microscopiche

Alterazioni istologiche caratteristiche della malattia di Alzheimer sono le placche neuritiche e i grovigli neurofibrillari.

1.2.1 Placche neuritiche

Le **placche neuritiche** o placche senili sono strutture a localizzazione extracellulare di forma rotondeggiante con un diametro di 50-200 μm , si sviluppano in alcune aree del cervello come ippocampo, paraippocampo, amigdala,

lobi temporali inferiore e superiore. Le placche comprendono una zona centrale costituita da aggregati fibrillari di un peptide, la β -amiloide ($A\beta$), circondata da neuriti distrofici con prolungamenti assionali tortuosi e dilatati. Attorno alle placche sono presenti due tipi di cellule gliali attivate: le cellule microgliali e gli astrociti. Questo tipo di placche si trova anche nel cervello di persone anziane sane, ma in numero molto più ridotto.

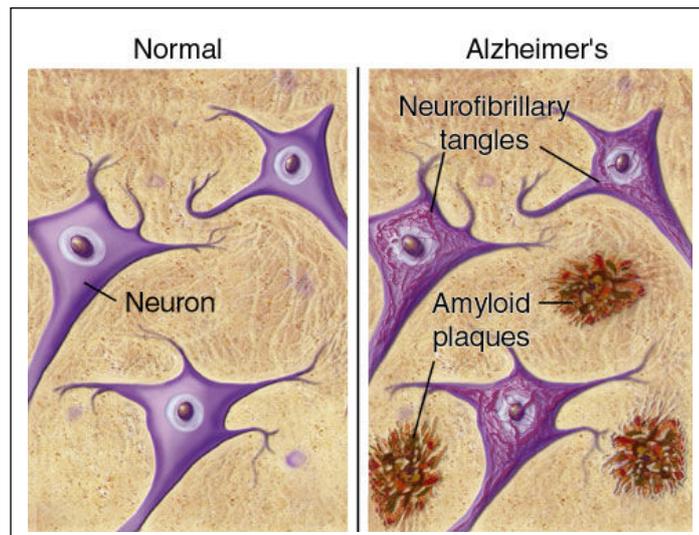


Fig. 3 - Placche neuritiche. Grovigli neurofibrillari.

1.2.2 Grovigli neurofibrillari

Altre caratteristiche microscopiche della malattia di Alzheimer sono le strutture neurofibrillari intracellulari, **neurofibrillary tangles** (NFT), la diminuzione del numero delle sinapsi sia in assoluto che per singolo neurone e la perdita di neuroni. La diminuzione del numero di sinapsi, accompagnata da una diminuzione del neurotrasmettitore acetilcolina, correla col decorso e con l'entità della malattia.

NFT sono fasci di filamenti elicoidali appaiati (PHF, paired helical filaments), formati dalla proteina citoscheletrica τ iperfosforilata, che si accumulano nel corpo cellulare (1) dei neuroni prevalentemente nell'ippocampo, nella corteccia entorinale, nell'amigdala e nei nuclei del proencefalo basale. La proteina τ è stata identificata come un fattore essenziale per la formazione dei microtubuli, da cui l'inclusione nella categoria MAP (microtubule-associated protein).

Un funzionamento ottimale di τ dipende da un meccanismo dinamico di fosforilazione/defosforilazione in siti specifici, soprattutto ad opera di chinasi come GSK-3 β e Cdk-5 (come descritto nella sez. 3.3). L'iperfosforilazione all'interno della regione di legame ai microtubuli abolisce completamente l'interazione di τ con i microtubuli, mentre la fosforilazione in siti adiacenti riduce questa interazione. L'effetto della iperfosforilazione di τ è la perdita di capacità della stessa di interagire con i microtubuli, che di conseguenza si destabilizzano ed eventualmente depolimerizzano, provocando la morte neuronale.

1.3 Forme cliniche

Diverse sono le forme cliniche della malattia di Alzheimer:

- ❖ ***Forme sporadiche ad insorgenza tardiva.***

Sono le più comuni e comprendono l'85-90% dei casi e non hanno cause ben definite. La durata media della malattia, dall'insorgenza dei sintomi alla morte, è compresa tra i 7 e i 10 anni. Tra gli eventi eziologici indicati per queste forme ci sono virus, traumi cranici, insufficienze circolatorie croniche, ma il fattore di rischio più importante è l'*invecchiamento*.

- ❖ ***Forme familiari ad insorgenza precoce.***

- ❖ ***Forme familiari ad insorgenza tardiva.***

- ❖ ***Forma associata con la sindrome di Down.***

Le forme familiari (2) sono autosomiche dominanti e sono determinate dalle mutazioni di almeno tre geni (APP, PS1, PS2) coinvolti nella sintesi e nel processamento di A β , il frammento peptidico che è il principale costituente delle placche.

APP (amyloid precursor protein) è una glicoproteina transmembrana da cui derivano i peptidi amiloidogenetici (vedi sezione 2.2). Le mutazioni a carico del gene che codifica l'APP hanno l'effetto di produrre una proteina che viene più efficacemente processata dalle β - e γ -secretasi nella via amiloidogenetica. L'insorgenza della malattia avviene tra i 45 e i 65 anni.

PS1 (presenilina-1) è una delle proteine responsabili dell'attività γ -secretasica. L'attività della γ -secretasi è associata con un complesso di proteine ad alto peso molecolare in cui la PS1 risulta esserne il sito attivo.

Le mutazioni a carico del gene codificante per PS1, risultano nell'aumentata sintesi di A β , nell'alterazione della regolazione del Ca²⁺ e forse nell'apoptosi mediata da proteine G. La malattia si manifesta tra i 28 e i 50 anni.

PS2 (presenilina-2) è la seconda proteina, omologa a PS1, che è stata ipotizzata avere una funzione γ -secretasica e che sembra agire in sinergia con PS1. Le mutazioni a carico di questo gene, inducono effetti analoghi a quelli di PS1, con l'unica differenza che l'esordio della malattia è più tardivo, tra i 40 e i 55 anni.

Mutazioni in APP, PS1 e PS2 spiegano il 40% dei casi di FAD (familial Alzheimer disease). L'insorgenza della malattia di Alzheimer infatti è influenzata anche da altri fattori genetici, conosciuti come *fattori di rischio*. Tra questi il più importante è il gene dell'apolipoproteina E (Apo E).

Apo E4 codificata dall'allele ϵ 4 del gene ApoE, è finora considerato il più importante fattore di rischio nello sviluppo della forma ad esordio tardivo (1). Ogni copia dell'allele ϵ 4 sembra aumentare il rischio di sviluppare la malattia.

Altri fattori di rischio collegati alla malattia di Alzheimer ad esordio tardivo sono poi il **complesso I del mtDNA**, che favorisce la produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) nei mitocondri dei neuroni, e polimorfismi del mtDNA.

Recentemente sono stati costruiti *modelli animali* della malattia di Alzheimer, inserendo nel genoma di questi animali geni umani mutati, responsabili di una o dell'altra forma familiare della malattia. Questi animali sviluppano una patologia simile all'Alzheimer sia sul piano patologico che sul piano dell'espressione comportamentale (incapacità di memorizzare, riduzione dell'apprendimento, difetti di orientamento). Ci sono delle differenze tra la malattia sperimentale sull'animale e la malattia umana (3), ma questo problema non è oggetto di questa trattazione.

PATOGENESI

2.1 Ipotesi della β -amiloide

Secondo l'ipotesi più accreditata (4), l'evento patogenetico chiave responsabile della degenerazione dei neuroni e delle modificazioni morfologiche, funzionali e cognitive è l'eccessiva formazione o accumulo di peptidi amiloidogenetici, derivati dalla proteolisi di una glicoproteina transmembrana, presente in tutte le cellule, ma prevalentemente nei neuroni, e a funzione non nota, chiamata APP (amyloid precursor protein).

2.2 Formazione, degradazione e rimozione dei peptidi di β -amiloide

Il processamento di APP, ad opera di due secretasi che agiscono in sequenza, viene distinto in *via amiloidogenica* e in *via non-amiloidogenica*, a seconda che risulti o meno nella produzione del peptide $A\beta$.

APP può essere inizialmente tagliata da α -secretasi (via non-amiloidogenica) o da β -secretasi (via amiloidogenica).

Entrambe le secretasi generano un frammento solubile (*Fig. 4*) rilasciato nell'ambiente extracellulare, l' $sAPP\alpha$ e l' $sAPP\beta$ rispettivamente, ed un frammento C-terminale che resta ancorato alla membrana, l' $\alpha APP-CTF$ e il $\beta APP-CTF$ rispettivamente. Quest'ultimo frammento viene utilizzato come substrato dalla γ -secretasi che genera un frammento solubile, il peptide p3 che corrisponde

alla regione 17-40/42 della sequenza A β nella via non-amiloidogena, ed un frammento con caratteristiche fibrillogene, A β , di 40/42 amminoacidi nella via amiloidogena (sito γ).

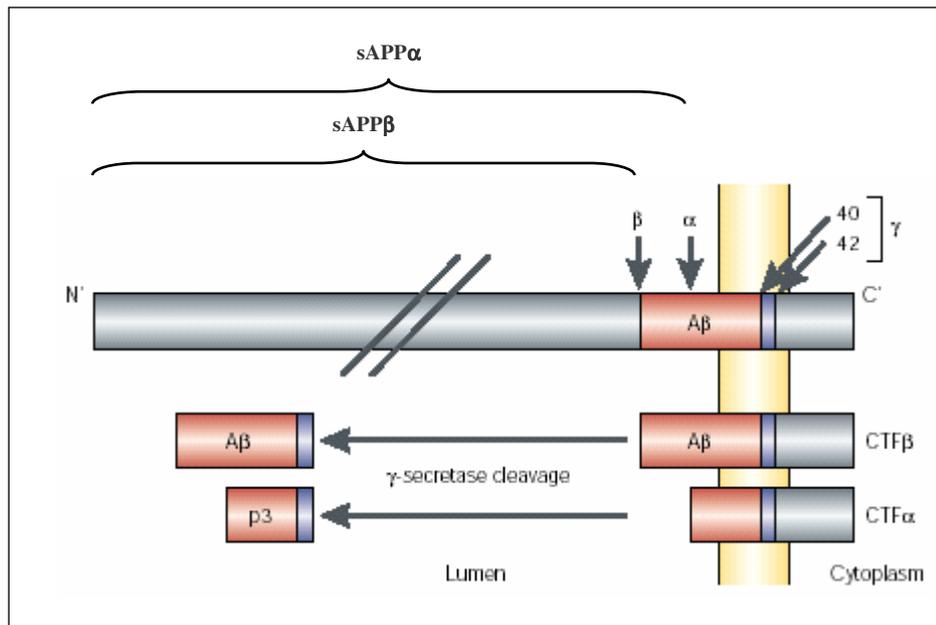


Fig. 4 - Formazione del peptide β -amiloide.

La γ -secretasi nella via amiloidogena può tagliare il β APP-CTF in due diversi punti della sua sequenza: γ -40 o γ -42, generando così due diversi peptidi di amiloide, l'A β_{1-40} e l'A β_{1-42} , in grado di assumere la conformazione a foglietto β e di aggregarsi in fibrille.

Come esistono meccanismi fisiologici per la produzione di A β , analogamente esistono meccanismi fisiologici di rimozione dei peptidi. Sono stati individuati due meccanismi principali:

- il primo riguarda il **trasporto di A β** , prevalentemente nella forma A β_{1-40} , attraverso la barriera emato-encefalica nella circolazione (5). Il meccanismo di trasporto nel sangue è mediato principalmente da LRP-1 (LDL receptor-related protein-1) presente sull'endotelio microvascolare cerebrale;

- il secondo riguarda la **degradazione di A β** , soprattutto della forma A β_{1-42} , mediante peptidasi (6,7) come per esempio NEP (neutral endopeptidase) e IDE (insulin degrading enzyme).

2.3 Principali forme di β -amiloide

Le principali forme di A β sono costituite da peptidi di 40 o 42 aminoacidi (A β_{1-40} e A β_{1-42}), distinguibili per il diverso COOH-terminale (Val40 o Ala42).

La forma più lunga (A β_{1-42}), dotata di due residui aminoacidici idrofobici aggiuntivi, è in grado di aggregarsi più rapidamente e formare fibrille ed è il peptide che si deposita inizialmente per la formazione delle placche (8).

La A β nel tessuto cerebrale esiste in diversi stati di aggregazione (*Fig. 5*), come monomeri, dimeri e oligomeri ad alto peso molecolare; l'ulteriore aggregazione di questi ultimi genera le protofibrille ed infine le fibrille (9).

Solo le fibrille tuttavia sono alla base della formazione delle placche, presenti sia nel cervello di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer, che in soggetti anziani sani.

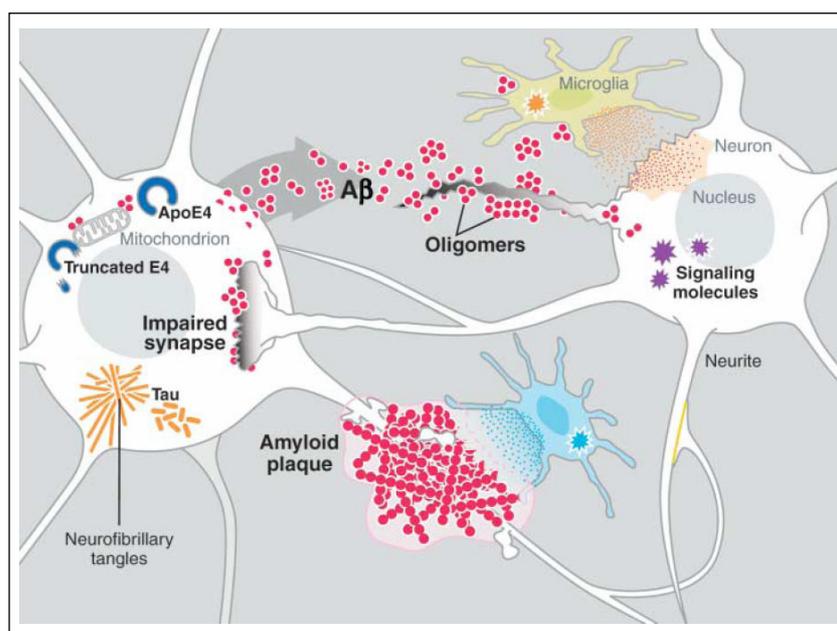


Fig. 5 - Diversi stati di aggregazione della β -amiloide nel tessuto cerebrale.

2.4 Meccanismi con cui la β -amiloide produce danni neuronali e funzionali

I peptidi di $A\beta$ sono neurotossici *in vitro*. Nei primi studi presenti in letteratura si era confrontato l'effetto delle fibrille rispetto ai monomeri e si era visto che questi ultimi non davano effetto di tossicità (10). Quindi è stata studiata principalmente la forma fibrillare della $A\beta$, considerata responsabile degli effetti citotossici osservati nelle condizioni sperimentali.

Secondo l'ipotesi della cascata della beta-amiloide l'accumulo di $A\beta$ in forma fibrillare a livello delle placche, danneggia i neuroni attraverso due differenti meccanismi: un *meccanismo diretto* ed un *meccanismo indiretto* (Fig. 6).

1. Nel *meccanismo diretto*, $A\beta$ interagisce con componenti della membrana cellulare e danneggia direttamente i neuroni e/o aumenta la suscettibilità dei neuroni ad una varietà di fattori di danno, come l'eccitotossicità, l'ipoglicemia o il danno perossidativo (11)
2. Nel *meccanismo indiretto*, $A\beta$ danneggia i neuroni indirettamente tramite l'attivazione della microglia e degli astrociti a produrre mediatori tossici ed infiammatori, come ad esempio l'ossido nitrico (NO), le citochine e gli intermedi reattivi dell'ossigeno (12,13), che causano la morte dei neuroni per apoptosi o per necrosi.

2.5 Critiche all'ipotesi della cascata della β -amiloide

Negli ultimi anni si sono accumulate prove con modelli animali (topi transgenici) che mettono in dubbio la validità dell'ipotesi della $A\beta$ nella sua enunciazione primitiva, e cioè che i deficit cognitivi dell'Alzheimer siano dovuti all'effetto citotossico che si verifica a livello delle placche da parte della $A\beta$ in forma fibrillare. La critica principale, che deriva da una parte da studi sui rapporti tra deficit mentale e quadri anatomo-istologici e dall'altra sulla malattia sperimentale negli animali, è che i deficit funzionali, cioè perdita della memoria, deficit

cognitivi oppure deficit di apprendimento, non correlano né temporalmente né quantitativamente con la formazione delle placche e quindi con l'accumulo di A β in forma fibrillare (14) come illustrato in Fig. 6.

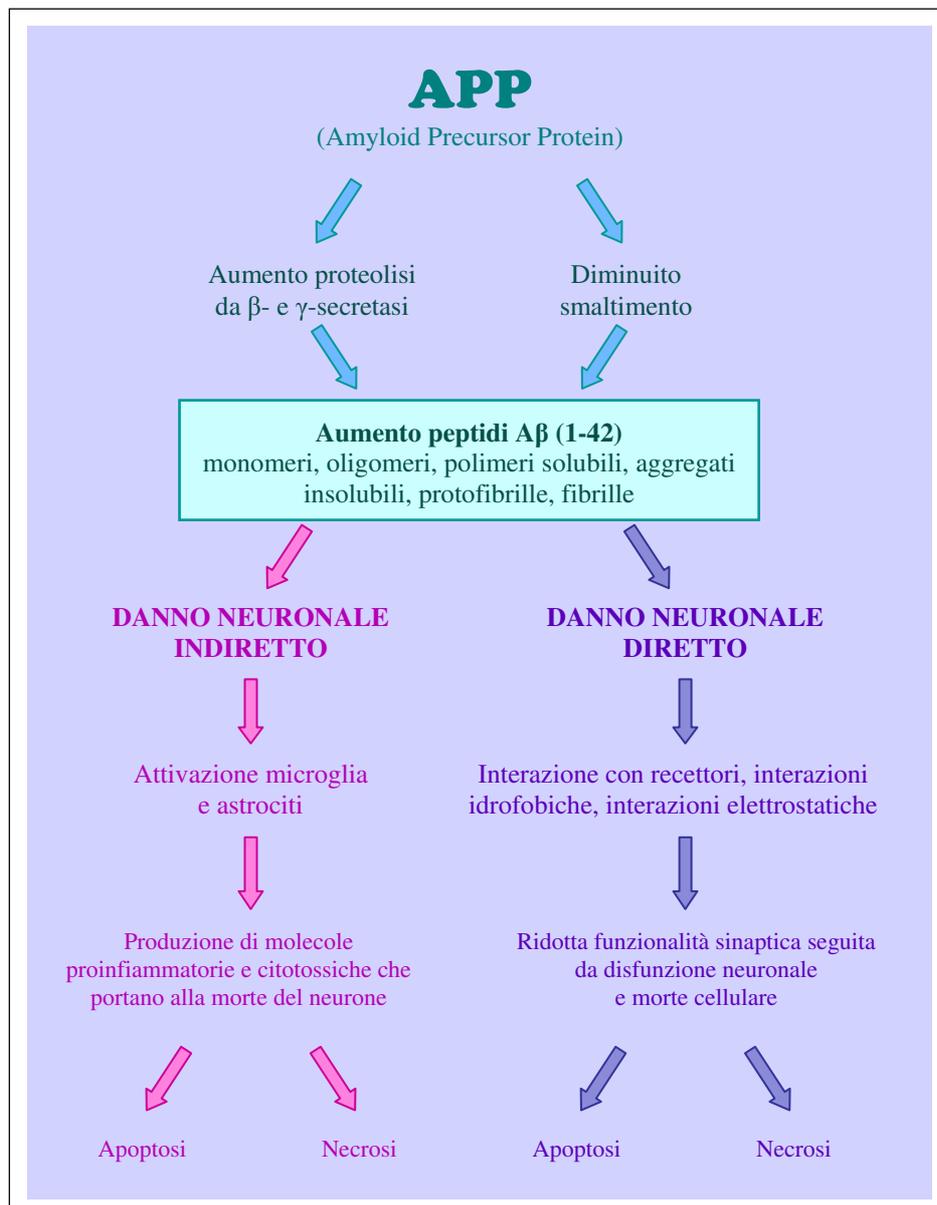


Fig. 6 - Meccanismi di tossicità della β -amiloide.

Da questa osservazione sono partiti molti studi nel tentativo di formulare una nuova versione dell'ipotesi della β -amiloide nella quale il ruolo chiave della A β nella patogenesi della malattia sarebbe mantenuto, ma la forma patogena non

sarebbe solo quella fibrillare, ma anche altre quali piccoli oligomeri solubili e protofibrille, cioè forme precedenti la loro aggregazione in forma fibrillare (11). Diverse prove sostengono questa nuova versione della “ipotesi della β -amiloide”:

- nel cervello di pazienti affetti da Alzheimer sono state ritrovate forme solubili di $A\beta$ oltre a quelle fibrillari (15);
- la perdita di sinapsi correla con un aumento di oligomeri solubili (animali transgenici);
- gli oligomeri solubili sono in grado di produrre modificazioni della funzionalità e della plasticità sinaptica (diminuzione della “Long Term Potentiation” e un aumento della “Long Term Depression”) (16,17);
- anticorpi anti-oligomeri sono in grado di eliminare i deficit di memoria in modelli animali, senza alcun effetto sulle placche.

Pertanto la nuova versione dell’ipotesi della β -amiloide includerebbe l’effetto tossico degli oligomeri solubili a livello delle sinapsi che precederebbe quello dovuto alle fibrille responsabile della morte cellulare coincidente con la formazione delle placche (*Fig. 6*).

RECETTORE PER IL FATTORE DI CRESCITA INSULINO-SIMILE DI TIPO 1 (IGF1-R)

3.1 IGF1-R e il suo sistema di signaling

Il recettore per il fattore di crescita insulino-simile di tipo 1 è una proteina transmembrana, formata da due subunità α (135 kDa ciascuna) e due subunità β (90 kDa ciascuna).

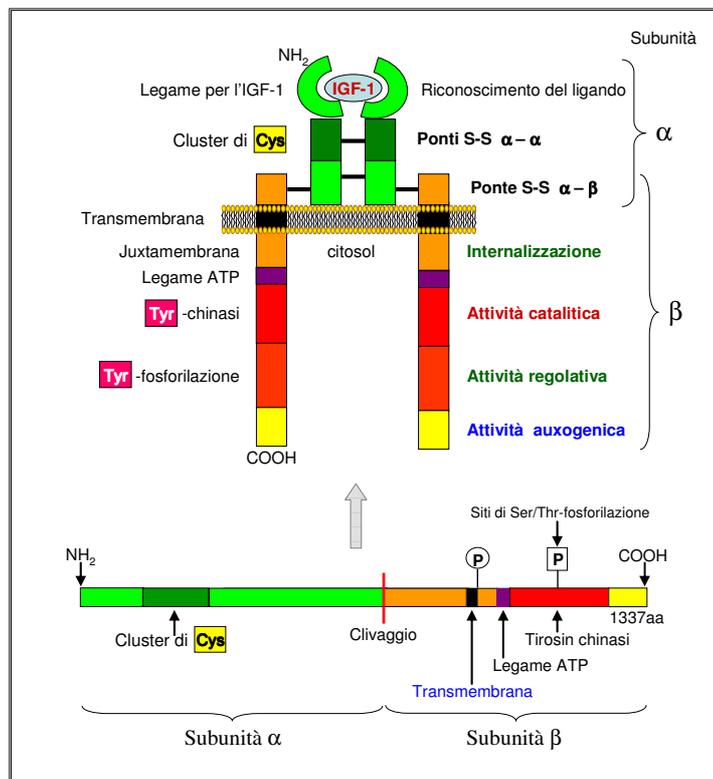


Fig. 7 - Struttura di IGF1-R. Per concessione del Prof. Lorenzo Colombo.

Le due subunità α , interamente extracellulari, contengono il sito di legame per l'ormone; le due subunità β che attraversano la membrana e sono principalmente intracellulari, possiedono l'attività tirosin-chinasica.

Il cluster di Cys consente la formazione di legami disolfuro tra le subunità: due ponti disolfuro tra le due subunità α e un ponte disolfuro tra ogni subunità α e subunità β .

IGF1-R, espresso da quasi tutte le cellule dell'organismo, risulta strutturalmente e funzionalmente correlato con il recettore per l'insulina (IR). L'omologia fra i due recettori è circa del 60%.

IGF1-R lega preferenzialmente IGF1, possiede un sito ad alta affinità per IGF2 ed è in grado di legare, seppur in maniera minore, l'insulina. L'espressione di questo recettore è regolata dallo stesso IGF1, da fattori stimolanti come PDGF, oncogeni, fattori di trascrizione e da fattori inibenti come le stesse IGFBP (1-6), l'insulina e geni oncosoppressori (18).

Il legame del recettore con IGF1 determina un cambiamento conformazionale delle due subunità α e β che porta all'attivazione dei loro siti tirosinchinasici che così si fosforilano reciprocamente, (autofosforilazione del recettore). Alle tirosine fosforilate del recettore poste in vicinanza del plasmalemma (receptor juxtamembrane domain) si legano le proteine substrato, IRS (1-2) (insulin receptor substrate). Queste possiedono un dominio PH (plecstrin homology; omologo della proteina plecstrina) a livello dell'N-terminale che presenta un sito di legame per i fosfolipidi del plasmalemma, ed un dominio PTB di legame per le fosfotirosine (phosphotyrosine binding) del recettore. Il legame di IRS al recettore determina la fosforilazione di residui tirosinici del C-terminale di IRS che acquisisce così la capacità di legarsi a proteine con un dominio SH2 (src homeodomain 2), come l'enzima PI3K (fosfatidil inositolo 3-chinasi) e la proteina adattatrice GRB2. Il legame di IRS polifosforilato con proteine con il dominio SH2 determina la loro transizione dallo stato inattivo allo stato attivo. L'attivazione di PI3K attiva la via dei 3-fosfoinositidi, mentre quella della GRB2 attiva la cascata delle MAP (mitogen activated protein) chinasi.

Poiché IRS è legato ai fosfolipidi del plasmalemma mentre attiva la PI3K, questa può fosforilare in posizione 3 il fosfatidil inositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) ivi presente, convertendolo a fosfatidil inositolo 3,4,5-trisfosfato (PIP3). Al PIP3 nel plasmalemma si legano 2 serinchinasi: la protein chinasi dipendente dai

3-fosfoinositidi (PDK1) e la serina-treonina chinasi (Akt) chiamata anche proteinchinasi B (PKB). PDK1, attivata da PIP3, fosforila sia la Akt/PKB sul plasmalemma che la protein chinasi C (PKC) nel citosol attivandole. La Akt/PKB fosforila varie proteine, come BAD (antiapoptotica), GSK-3 β (regolante la crescita e la sintesi di glicogeno) e FOXO1 (regolante la gluconeogenesi).

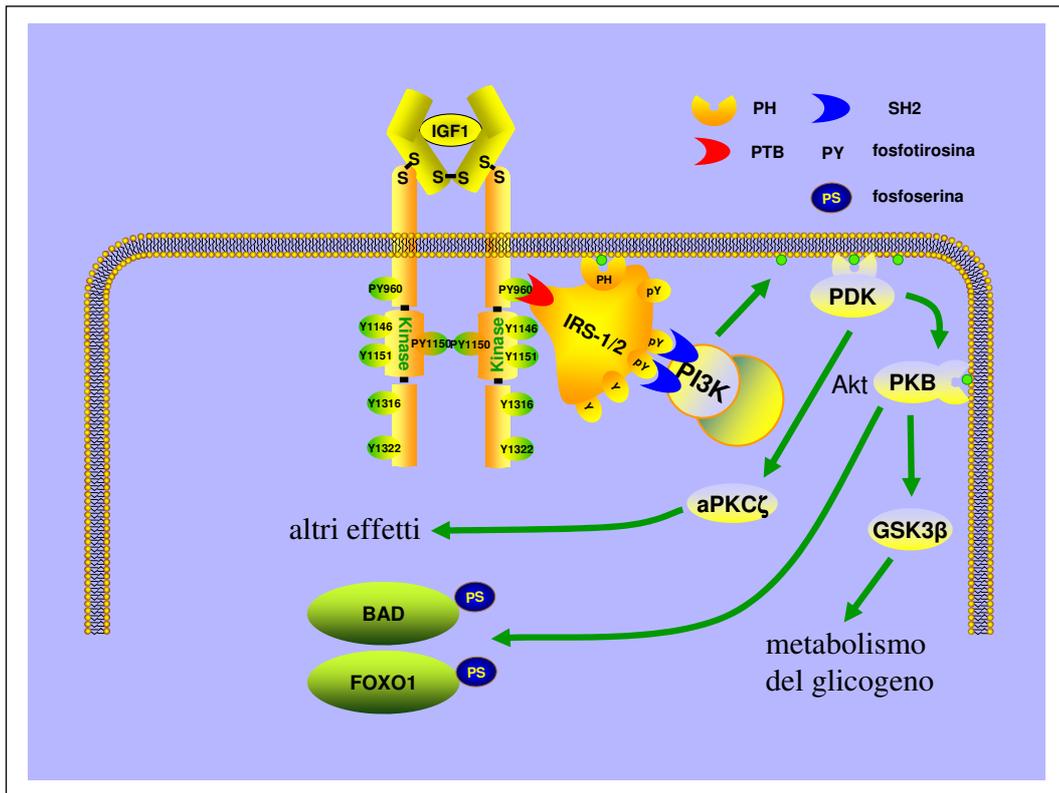


Fig. 8 - Trasduzione del segnale recettoriale di IGF1. Via dei PIP3. Per concessione del Prof. Lorenzo Colombo.

Il legame di IRS polifosforilato a GRB2 sposta il suo dominio SH2 dal sito attivo, che acquisisce così la capacità di legarsi al dominio ricco di prolina della proteina adattatrice SOS attivandola. Il complesso SOS-GRB2 si lega alla proteina RAS che sostituisce il legame con GDP a quello con GTP attivandosi. RAS-GTP si lega alla serinchinasi RAF e la attiva. Da qui parte una cascata di fosforilazione/attivazione (MAPKK, MAPK, S6K e PP-1) come illustrato in Fig. 9, che porta alla defosforilazione della glicogeno sintasi che, così attivata, defosforila la glicogeno fosforilasi disattivandola.

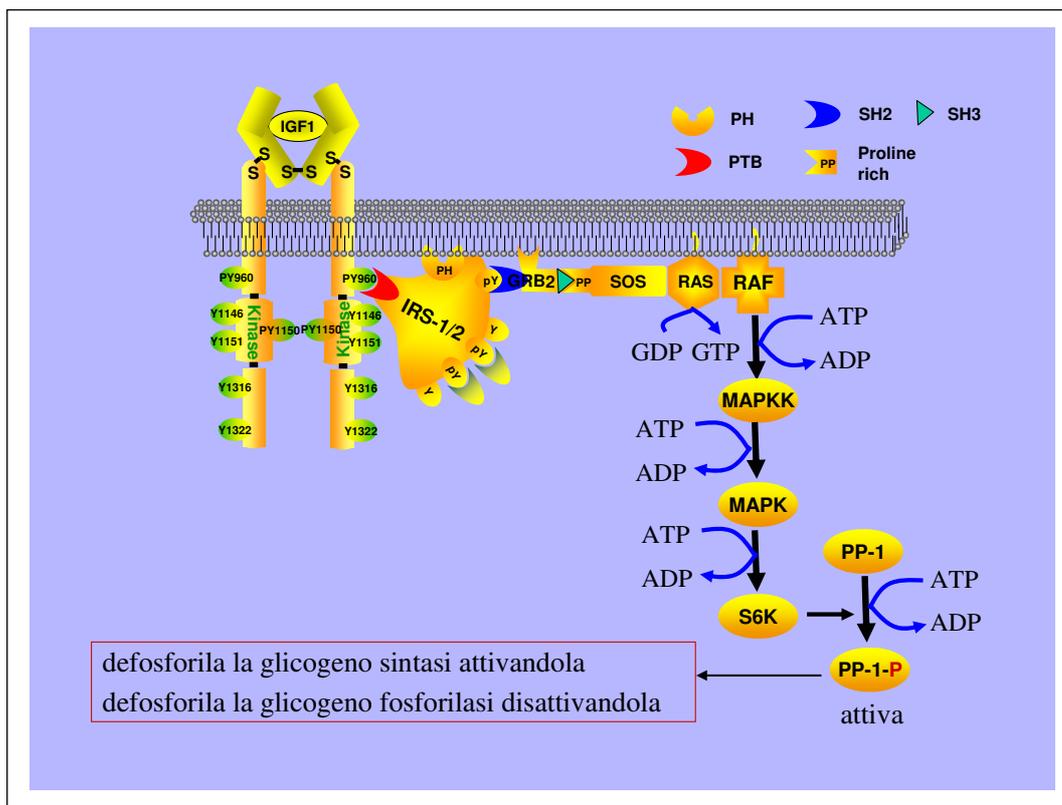


Fig. 9 - Trasduzione del segnale recettoriale di IGF1. Via delle MAPK. Per concessione del Prof. Lorenzo Colombo.

Questa cascata di segnali si traduce nei numerosi effetti dell'IGF1: la proliferazione cellulare, l'inibizione dell'apoptosi, l'aumento del trasporto del glucosio e del metabolismo dei carboidrati.

3.2 IGF1 e suo recettore nel cervello

L'ormone IGF1 viene rilasciato in circolo dal fegato, dove la sua sintesi è regolata dall'ormone della crescita (GH). Tuttavia molti altri tessuti, incluso il cervello, sono capaci di sintetizzare IGF1 localmente senza controllo da parte di GH circolante (19). Infatti i livelli di IGF1 nel siero diminuiscono dopo la pubertà in seguito alla diminuzione di GH, mentre i livelli di IGF1 nel sistema nervoso centrale rimangono costanti o presentano un leggero aumento durante l'invecchiamento (20).

IGF1 è un ormone neurotrofico, promuove la sopravvivenza e il differenziamento dei neuroni. È implicato nei processi di plasticità del cervello e modula l'efficienza sinaptica regolando la formazione delle sinapsi, il rilascio di neurotrasmettitori e l'eccitabilità neuronale (21). IGF1 fornisce anche un costante supporto trofico ai neuroni e una diminuzione nella sua concentrazione può portare a malattie cerebrali, come osservato in alcune patologie neurodegenerative in cui il quadro clinico migliora dopo somministrazione di IGF1 (22). La capacità di IGF1 di promuovere la sopravvivenza neuronale è associata alla capacità di questo fattore di impedire l'apoptosi. Il signaling di IGF1 ha un effetto neuroprotettivo a diversi danni apoptotici (21,23) inattivando proteine implicate nel meccanismo apoptotico (23).

Sia IGF1-R che IR sono ampiamente espressi nel cervello (19). Questi recettori sono co-espressi in molte aree, incluse la corteccia cerebrale, l'ippocampo e i capillari fenestrati dove mediano la traslocazione ad alta efficienza dell'insulina e di IGF1 attraverso la barriera ematoencefalica (19).

Come detto nella sezione precedente, IGF1-R e IR mostrano un alto grado di somiglianza strutturale, possono formare eterodimeri (24), hanno funzioni parzialmente sovrapposte, ed inoltre l'insulina può legarsi a IGF1-R e IGF1 a IR.

Sebbene i livelli di IGF1 nel sistema nervoso centrale rimangano costanti o aumentino leggermente durante l'invecchiamento (20), l'espressione del suo recettore mostra un forte aumento sia nell'ippocampo che nella corteccia. L'aumento nei livelli di IGF1-R nell'ippocampo, la regione del cervello importante per l'apprendimento e la memoria, correla con i deficit di apprendimento nei ratti durante l'invecchiamento (25). Inoltre, sia IGF1 che insulina possono causare l'iperfosforilazione della proteina τ , la principale componente dei grovigli neurofibrillari (*vedi sezione 1.2.2*), nei neuroni corticali primari (26).

3.3 IGF1-R e malattia di Alzheimer

Come descritto nel paragrafo precedente, numerose evidenze sperimentali sostengono il ruolo di IGF1 nella crescita neuronale, nella sopravvivenza e nella plasticità sinaptica. Perciò è plausibile che nelle malattie neurodegenerative la via di signaling di questo recettore sia alterata o agisca in maniera inefficiente.

Recenti risultati hanno infatti dimostrato che nel cervello di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer l'espressione del recettore per IGF1, per l'insulina e delle proteine substrato IRS1 e IRS2 è alterata, indicando che il signaling di IGF1 e di insulina sono compromessi (27).

Attualmente non è ancora chiaro se i cambiamenti nell'espressione dei diversi componenti della cascata di signaling di insulina/IGF1 sono causa o conseguenza della malattia di Alzheimer.

Il deficit del signaling di IGF1 osservato nei pazienti con AD è stato anche associato con l'iperfosforilazione di τ che sta alla base della formazione di NFT. Infatti le chinasi responsabili della fisiologica fosforilazione di τ che includono ERK e Cdk-5, sono entrambe attivate da IGF1 e insulina. Un signaling alterato porterebbe ad una ridotta attivazione di PI3K/Akt che libera dall'inibizione la GSK-3 β responsabile della iperfosforilazione di τ (26).

È stato visto inoltre che nel modello murino di malattia di Alzheimer (topi transgenici che esprimono APP umana mutata) la somministrazione di IGF1 favorisce la rimozione di A β dal cervello potenziando l'espressione di proteine carrier di A β come l'albumina e transtiretina (25).

Il ruolo di IGF1-R nella sopravvivenza neuronale in condizioni patologiche è oggi controverso: una serie di evidenze indica che un deficit del signaling del recettore è alla base dei meccanismi patogenetici, altre evidenze indicano invece che un suo ridotto signaling porterebbe al miglioramento del quadro clinico.

È stato recentemente osservato, utilizzando il modello murino della malattia di Alzheimer incrociato con topi mancanti di IRS2, che una riduzione del signaling di IGF1 diminuisce l'accumulo di A β e aumenta la sopravvivenza di questi topi (28). Inoltre, quando topi mutati venivano incrociati con topi che esprimevano ridotte quantità di IGF1-R, essi risultavano protetti dalla malattia e presentavano minori deficit comportamentali, minore neuroinfiammazione e minore perdita di neuroni (29). Questa protezione sarebbe riconducibile ad una iperaggregazione della A β in placche fortemente addensate, suggerendo che un aspetto della protezione conferita dal ridotto signaling di IGF1, sia il sequestro degli oligomeri solubili di A β in aggregati densi di minore tossicità (29).

3.4 La via di signaling insulina/IGF1 regola la longevità

La via di signaling attivata da insulina/IGF1 è evolutivamente conservata in diverse specie, inclusi i nematodi gli insetti e i mammiferi (30,31,32).

Una serie di studi ha evidenziato un coinvolgimento di insulina/IGF1 nella regolazione dell'invecchiamento e una ridotta attività di questa via è comunemente associata con una maggiore longevità (30,31,32).

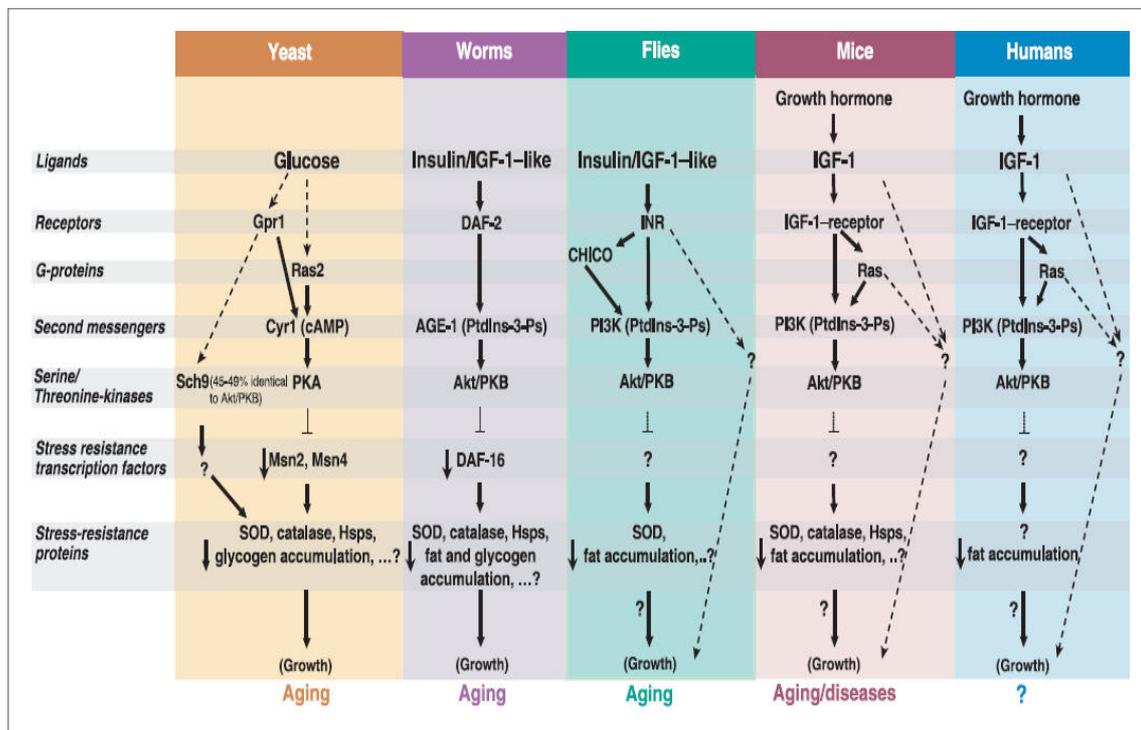


Fig. 10 - Regolazione della longevità, attraverso la via insulina/IGF1, evolutivamente conservata in lieviti, vermi, insetti e mammiferi. (30).

Ad esempio, in *C. elegans* e in *D. melanogaster*, mutazioni nei geni *age-1*, che codifica per la subunità catalitica di Akt, e *daf-2*, che codifica per un recettore simile al recettore per insulina e IGF1, aumentano la durata della vita. Mentre mutazioni nei geni *age-1* e *daf-2* estendono la durata della vita, mutazioni in *daf-16*, che codifica un fattore di trascrizione regolato dall'insulina e da IGF-1, sopprimono questo effetto. Nel topo, a differenza di nematodi e insetti, il recettore per l'insulina e quello per IGF1 sono distinti (Fig. 10).

I topi knock-out per un allele del recettore per IGF1 hanno in media un aumento del 26% della durata di vita e i topi che mancano del recettore per l'insulina nel tessuto adiposo vivono circa il 18% più a lungo dei topi controllo.

L'effetto sulla longevità da parte di IGF1 sembra dipendere da fattori di trascrizione (come ad esempio FOXO) appartenenti alla famiglia delle proteine Forkhead (*Fig. 11*).

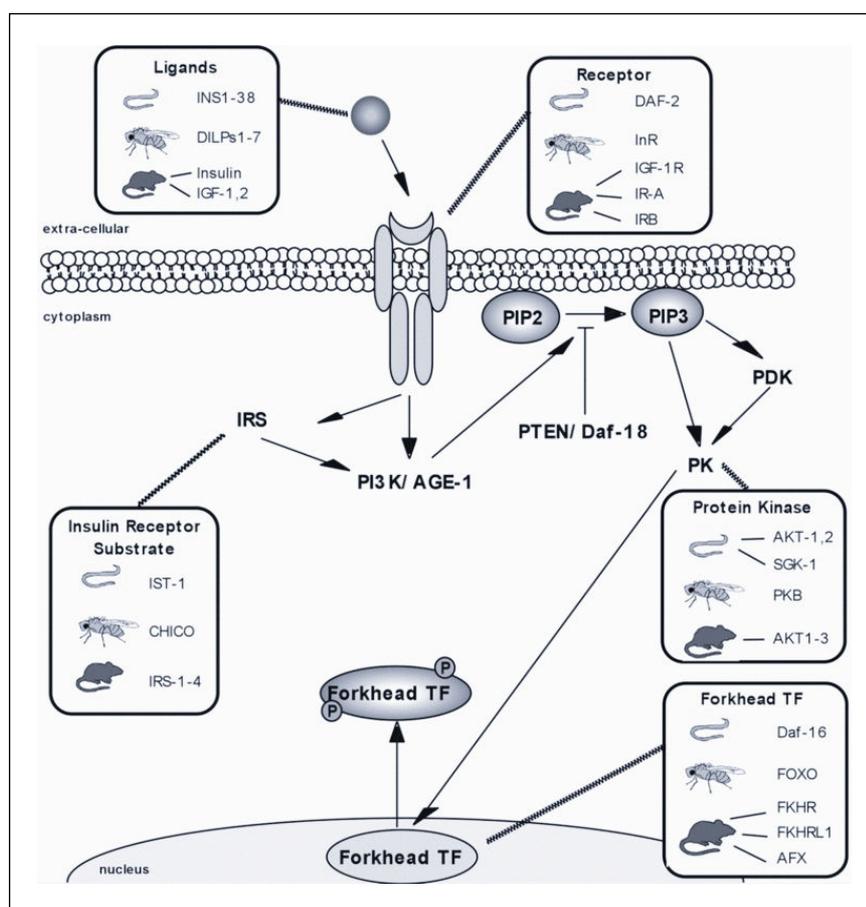


Fig. 11 - Via insulina/IGF1 in *C. elegans*, *D. melanogaster* e nel topo. (32).

Questi fattori di trascrizione vengono regolati da una via di signaling che provoca, in seguito al legame del ligando (insulina/IGF1) al recettore (daf-2/InR/IGF1-R), l'attivazione di Akt/PKB e la successiva fosforilazione di daf-16/FOXO che viene così inibita. Daf-16/FOXO fosforilata si localizza nel citoplasma, impedendo la trascrizione genica, ne risulta così un'inibizione di funzione (*Fig. 12*).

Al contrario, in assenza di fattori di crescita, la via di signaling non viene attivata e dalla mancata fosforilazione di daf-16/FOXO ne consegue una sua traslocazione nucleare e questo porta alla trascrizione genica (Fig. 12).

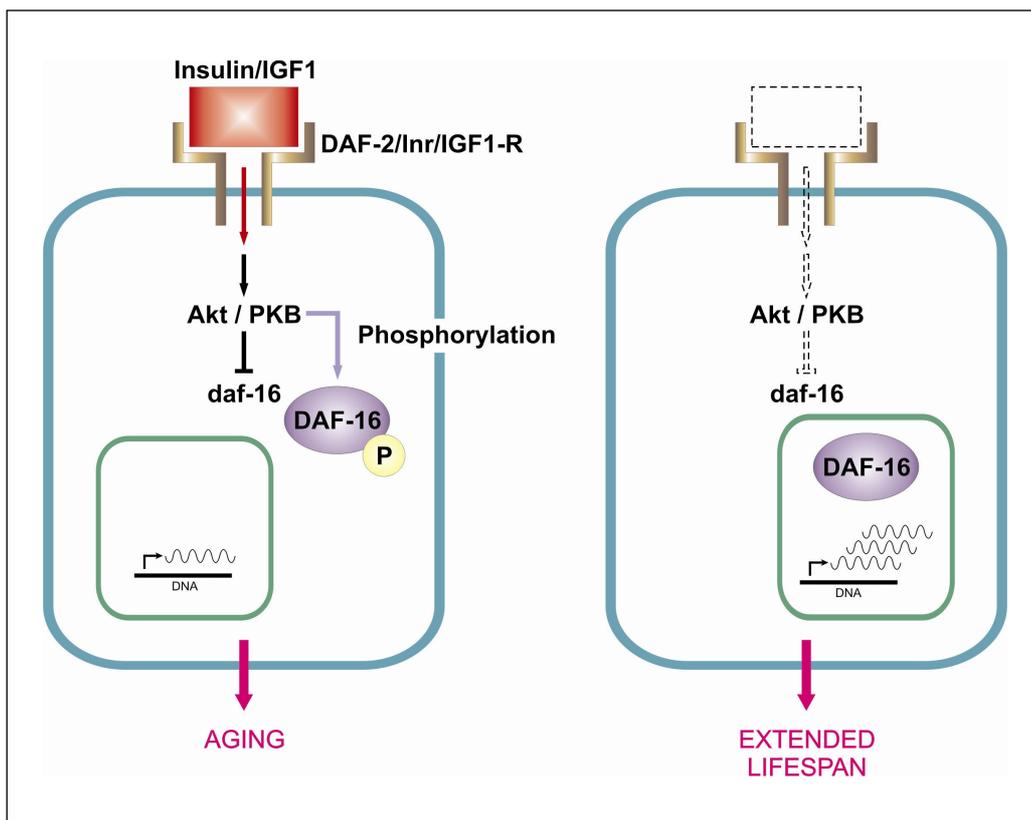


Fig. 12 - Localizzazione nucleare di daf-16 dipendente da daf2.

Questi fattori di trascrizione attivano geni che producono proteine antiossidanti (es. SOD, catalasi) che difendono la cellula dai radicali liberi dell'ossigeno, geni che producono chaperones cioè proteine che legano altre proteine e le difendono dalla denaturazione e quindi conferiscono resistenza alle malattie, geni che codificano per prodotti antimicrobici che proteggono dalle infezioni, geni metabolici che regolano il rinnovamento delle proteine ed infine geni coinvolti nell'accumulo di glicogeno.

Poiché questi geni proteggono dall'invecchiamento hanno un effetto sull'estensione della durata della vita, quindi più insulina/IGF1 si lega al recettore meno vengono

attivati i fattori di trascrizione, e di conseguenza questi geni, e più breve sarà la durata della vita (*Fig. 13*).

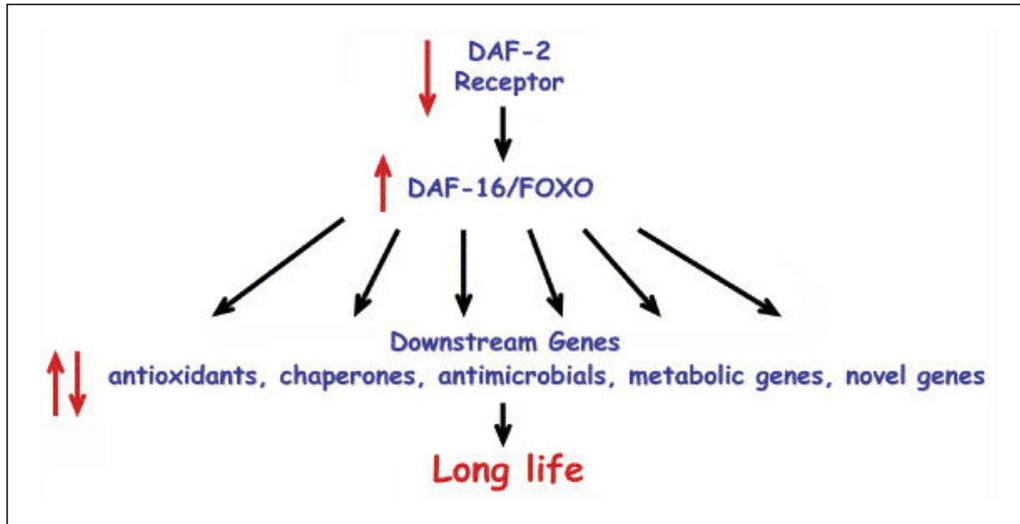


Fig. 13 - Modello della regolazione della longevità (31).

3.5 IGF1-R modula la produzione di A β nel cervello durante l'invecchiamento

Dati recenti in letteratura (33,34,25) hanno dimostrato che la generazione di A β nei neuroni durante l'invecchiamento è controllata da una sequenza di eventi che ha inizio con il legame del fattore di crescita insulino-simile di tipo 1 (IGF1) al suo recettore (IGF1-R).

Durante il normale invecchiamento l'espressione di IGF1-R aumenta nel cervello con attivazione di una via di signaling (33,25) che determina una modulazione differente nell'espressione dei due recettori per neurotrofine: p75^{NTR} e TrkA, come illustrato in *Fig.14*. In particolare l'espressione di TrkA diminuisce mentre l'espressione di p75^{NTR} aumenta.

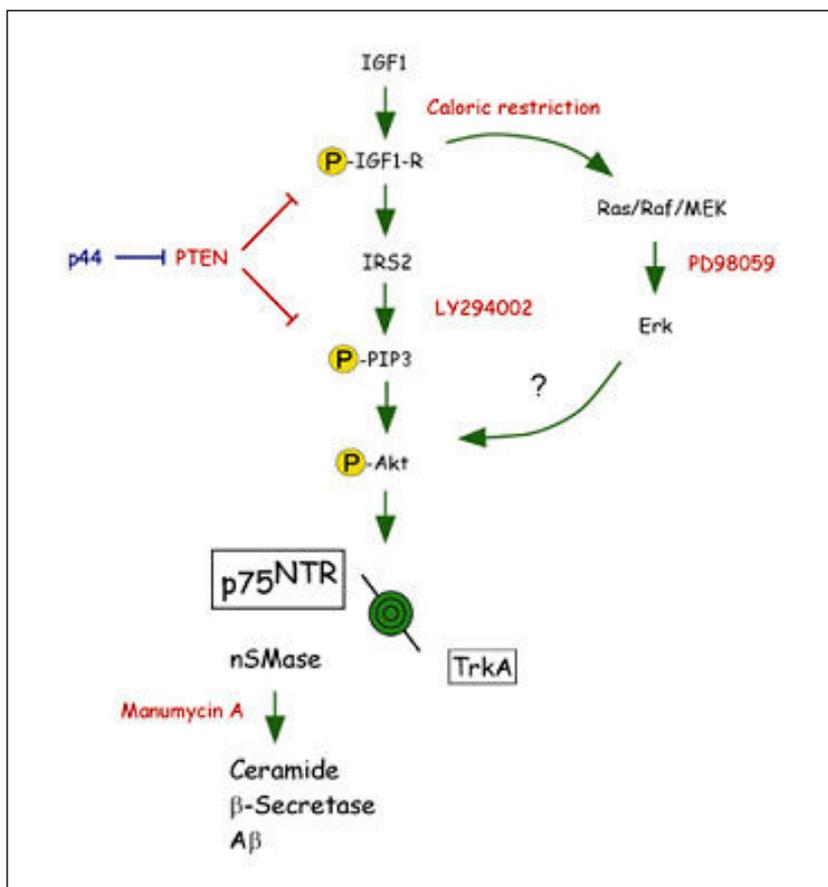


Fig. 14 - Via di segnalazione che controlla la generazione di A β durante l'invecchiamento. Le manipolazioni genetiche e farmacologiche sono indicate in rosso o in blu accanto alla componente della via di segnalazione che influenzano. Le manipolazioni indicate in rosso inibiscono la segnalazione mentre quelle in blu l'amplificano. Modificato da (33).

L'induzione di p75^{NTR} è seguita dall'attivazione di nSMase e dalla liberazione del secondo messaggero ceramide. Il ceramide è responsabile della stabilizzazione molecolare di BACE1 (β -secretasi), attraverso un meccanismo di acetilazione che avviene durante il trasporto e la maturazione della proteina nella via secretoria. Questa sequenza di eventi può essere bloccata sia da manipolazioni genetiche che biochimiche (indicate in rosso nella Fig. 14) le quali agiscono a livello o di IGF1-R o dei componenti di segnalazione a valle. Risultati simili possono essere osservati anche dopo delezione genetica di *ngfr* o inibizione biochimica di nSMase. Al contrario un'errata regolazione del rapporto p53:p44 (indicata in blu nella Fig. 14) porta all'iperattivazione di IGF1-R, al precoce passaggio da TrkA a p75^{NTR} e al prematuro aumento nella produzione di A β . La sovraespressione dell'isoforma corta di p53, chiamata p44, determina un fenotipo consistente con

un invecchiamento osseo accelerato. Questo fenotipo è causato da una iperattivazione della via di segnalazione da IGF1 e da una maggior espressione di IGF1-R, dovuta in parte alla perdita del controllo inibitorio di PTEN (33).

Le due vie principali implicate nella trasduzione del segnale da IGF1-R sono rappresentate da PI3K, che attiva Akt/PKB (*come descritto nella sezione 3.1*), e da Raf/MEK/Erk. Per identificare la specifica via di segnalazione che media gli effetti di IGF1 sul passaggio da TrkA a p75^{NTR}, sono stati condotti esperimenti (33) con LY294002, un inibitore generale di PI3K, e con PD98059, un inibitore che blocca la via Raf/MEK/Erk (indicati in rosso nella *Fig. 14*). Il risultato di questi studi ha indicato che PI3K ha un ruolo predominante nella regolazione dell'espressione dei recettori per neurotrofine da IGF1. Infine l'attivazione di PI3K/Akt richiede il legame delle proteine adattatrici IRS2 a IGF1-R (19).

Questi studi (33,34,25) hanno così dimostrato che la via di signaling di IGF1, illustrata in *Fig. 14*, è responsabile del collegamento tra invecchiamento e malattia di Alzheimer, in quanto è attivata durante l'invecchiamento nel cervello e determina un aumento nella produzione di A β secondo lo schema sopra descritto.

SCOPO DELLA TESI

Questo studio ha preso origine da risultati ottenuti in ricerche precedenti condotte nel laboratorio del Dr. L. Puglielli (Wisconsin-Madison) in cui è stato dimostrato, nel modello murino, che l'espressione del recettore per il fattore di crescita insulino-simile di tipo 1 (IGF1-R) aumenta a livello corticale durante l'invecchiamento con conseguente attivazione di una via di *signaling* che porta ad un aumento nei livelli di A β (33) (*come descritto nella sezione 3.5*). Analogamente, un aumento dell'espressione di IGF1-R e un conseguente accumulo di A β veniva osservato *in vitro* in colture di neuroni murini senescenti. Poiché l'accumulo di A β è strettamente connesso con l'insorgenza della malattia di Alzheimer, questi studi hanno suggerito una possibile spiegazione molecolare dell'invecchiamento come fattore di rischio per lo sviluppo della malattia.

Lo studio oggetto di questa tesi è stato quello di definire il meccanismo di regolazione di IGF1-R nei neuroni durante l'invecchiamento, allo scopo di fornire nuovi approcci farmacologici in grado di ritardare l'insorgenza della malattia.

Per studiare la senescenza dei neuroni abbiamo utilizzato colture neuronali primarie di ratto a lungo termine: tale approccio sperimentale *in vitro* rappresenta un buon modello per lo studio dell'invecchiamento del cervello poiché i neuroni sono post-mitotici, e quindi la senescenza cellulare, definita come la fine della vita mitotica in coltura, inizia dal momento in cui le cellule sono messe in coltura. Precedenti risultati, infatti, hanno dimostrato che l'intera sequenza di eventi, da IGF1-R alla produzione di A β , che si verifica *in vivo* nel cervello di topi di trenta mesi può essere osservata anche *in vitro* in neuroni murini senescenti (33).

MATERIALI E METODI

5.1 Colture di neuroni corticali primari di ratto

Le colture di neuroni corticali primari di ratto sono state ottenute estraendo le cortecce dai cervelli di ratto (Sprague-Dawley) al giorno embrionale 16-18 (E18-E20).

Le cortecce venivano raccolte e mantenute a 4°C in Hank's balanced salt solution (HBSS), contenente 10 mM di HEPES, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomycina. Dopo dissociazione chimica con una soluzione contenente 0.1% di tripsina (Gibco) e 0.2 µg/ml di DNase I (Sigma), il tessuto veniva dissociato meccanicamente in HBSS a 4° C con pipette gradualmente sempre più sottili.

Le cellule vitali venivano contaminate con una soluzione di trypan blue (0.2%) e seminate ad una densità di 500 cellule/mm² su superfici polilisinata. Dopo un'ora il terreno veniva sostituito con terreno fresco specifico per la crescita dei neuroni (Neurobasal medium supplementato con 2% B27, 0.5 mM L-glutammina, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomycina).

Dopo 4 giorni dalla semina metà del terreno di coltura veniva sostituito con terreno fresco. Questo giorno (il quinto dalla semina) veniva considerato il giorno "zero" della nostra coltura. Le colture cellulari venivano tenute a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5%.

Normalmente questa procedura permette di ottenere più del 95% di neuroni con meno del 5% di contaminazione di astrociti. Questa coltura veniva chiamata *coltura corticale arricchita in neuroni o coltura mista*.

5.2 Colture di neuroni corticali primari puri

In alcuni esperimenti, alle colture di 4 giorni veniva aggiunto 2.5 μ M di citosine arabinoside (Ara-C, Sigma), per inibire la proliferazione delle cellule gliali. Dopo 2 giorni di trattamento con Ara-C il terreno veniva cambiato per togliere l'inibitore e da quel momento in poi non veniva più cambiato fino alla fine dell'esperimento. La eventuale presenza di cellule gliali veniva valutata al microscopio a fluorescenza colorando le cellule con un anticorpo anti-gliale fibrillare acid protein (GFAP), marcatore specifico degli astrociti come descritto in dettaglio nella sezione 5.6. All'analisi microscopica questa popolazione cellulare appariva di soli neuroni e veniva chiamata *coltura neuronale pura*.

5.3 Colture di astrociti corticali primari

Gli astrociti corticali primari sono stati preparati seminando sospensioni cellulari, provenienti dalle cortecce cerebrali in flask non polilisinato (ciò impediva ai neuroni di attaccarsi) e contenenti DMEM (Biowhittaker) addizionato con 20% FBS (Biowhittaker). Il terreno veniva cambiato ogni 5 giorni fino a quando le cellule erano confluenti. Questo di solito avveniva intorno al quattordicesimo giorno di coltura in vitro. Successivamente, per isolare gli astrociti puri, le colture miste di cellule gliali venivano incubate con una soluzione di tripsina (0.25% di tripsina diluita in DMEM-F12 (1:3) come precedentemente riportato (35). Questa leggera tripsinizzazione dava come risultato il distacco dello strato superiore di cellule, che era costituito da astrociti con una purezza del 98%, come confermato dall'analisi al microscopio a fluorescenza. Gli astrociti venivano infine raccolti e fatti crescere in DMEM con 20% FBS.

5.4 Trattamenti delle colture neuronali

Il terreno condizionato (CM, Conditioned Medium) delle colture corticali arricchite di neuroni (neuroni e astrociti) di 3 e 24 giorni e quello degli astrociti

puri confluenti dopo una settimana di coltura in terreno Neurobasal addizionato con B27 (ACM), venivano raccolti e mantenuti a -20°C fino al loro utilizzo.

Nel giorno dell'esperimento il terreno condizionato veniva scongelato e riscaldato all'interno di un incubatore a 37°C e poi aggiunto alle colture neuronali ad un volume pari al 50% del volume iniziale della coltura.

Le cellule venivano raccolte dopo 3-4 giorni di trattamento.

In un esperimento preliminare, il CM di 24 giorni è stato caricato su una colonna per gel filtrazione Superdex 200XK 26/60 (GE Healthcare) equilibrata con tampone PBS.

Il volume iniettato era di 7 ml al flusso di 2.5 ml/min. La separazione dei componenti è stata seguita monitorando il segnale di assorbanza a 280 nm, tipico delle proteine.

Durante la separazione, sono state raccolte frazioni da 15 ml corrispondenti a volumi di eluizione da 160 a 280 ml; ogni frazione è stata concentrata utilizzando Amicon Ultra-3 (Millipore) con cut-off di 3 KDa e impiegata per trattare una coltura di neuroni puri.

Negli esperimenti di ultrafiltrazione, 3.5 ml del CM di 24 giorni o 3.5 ml del terreno di crescita fresco (unCM, unconditioned Neurobasal Medium) venivano caricati su concentratori Amicon Ultra-3 e centrifugati a 6000 x g per 2 ore a 4°C. Dopo centrifugazione, il filtrato (circa 3 ml) veniva raccolto mentre il trattenuto (0.35 ml) veniva riportato al volume iniziale utilizzando un unCM addizionato con B27. Entrambe le frazioni venivano poi aggiunte ad una coltura neuronale pura (di 3 giorni) ad un volume pari al 50% del volume iniziale della coltura. Dopo 3 giorni di trattamento le cellule venivano lisate come descritto nella sezione 5.7.

La digestione proteica veniva effettuata incubando il filtrato del CM di 24 giorni attraverso un concentratore Amicon Ultra-3 per 60 minuti a 25°C con tripsina o subtilisina ad una concentrazione finale di 1 µg di proteasi per µg di proteina contenute nel CM.

La digestione del filtrato veniva bloccata dall'ultrafiltrazione mediante un concentratore Amicon Ultra-3. Come controllo venivano fatti esperimenti analoghi di digestione proteica utilizzando il filtrato del unconditioned Neurobasal Medium addizionato con B27.

5.5 Co-culture di neuroni e astrociti

Gli astrociti corticali primari venivano seminati su filtri trans-well di poliestere, di 24 mm di diametro, con pori di grandezza $0.4 \mu\text{m}$ (Corning-Costar) ad una densità di 1.2 oppure 2.4 oppure $4.8 \cdot 10^4$ cellule/ mm^2 (corrispondenti a 2.5-5-10% della densità cellulare neuronale rispettivamente) e venivano coltivati in DMEM addizionato con 20% FBS per 3 giorni.

Il terreno veniva poi sostituito con terreno di coltura per i neuroni ed i trans-well, contenenti gli astrociti, venivano posti su una piastra da 6 well in cui si trovavano già i neuroni puri in coltura da 3 giorni. I neuroni venivano raccolti e lisati dopo 10-15 giorni di co-cultura con gli astrociti.

5.6 Immunocitochimica

Le cellule cresciute su vetrini polilisinati venivano lavate con PBS e fissate aggiungendo metanolo freddo per 3 minuti a 4°C .

Per saturare i siti di legame aspecifici le cellule venivano incubate per 30 minuti a temperatura ambiente (RT) in PBS contenente 5% FBS e 0.2% di saponina.

Le cellule venivano poi incubate per 2 ore a RT con un anticorpo anti-GFAP (1:1000, rabbit, Sigma) e con un anti-MAP2 (1:1000, mouse, Sigma) oppure overnight a 4°C con un anticorpo anti-IGF1-R (1:1000, rabbit, Cell Signaling). Tutti gli anticorpi venivano diluiti in PBS contenente 1% FBS e 0.2% saponina. Dopo 3 lavaggi con PBS, le cellule venivano incubate per 1 ora a RT con un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con il fluorocromo Cy3 (1:1000) e con un anticorpo anti-mouse coniugato con il fluorocromo Alexa Fluor 488 (1:1000). In alcuni esperimenti l'incubazione con l'anticorpo secondario era seguita da un'incubazione di 10 minuti con $3 \mu\text{M}$ di 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (1:1000, DAPI) diluito in PBS per la colorazione dei nuclei.

I vetrini coprioggetto venivano montati in una soluzione anti-bleaching (Dabco, Sigma) e analizzati con un microscopio a fluorescenza (DM6000B Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Germany). Le immagini venivano acquisite utilizzando una camera digitale Leica DC500 collegata ad una Leica Application

Suite Software. In alcuni esperimenti per valutare la presenza di cellule microgliali le colture venivano trattate con un anticorpo primario anti-CD11b (1:100, mouse, Serotec).

In alcuni esperimenti le cellule venivano analizzate al microscopio confocale (Leica-Microsystem, Wezlar, Germany).

Il numero degli astrociti veniva quantificato dopo colorazione delle cellule con anticorpi anti-GFAP, anti-MAP2 e DAPI, calcolando il numero relativo di cellule GFAP-positive rispetto a quello dei neuroni, in un minimo di dieci campi a ingrandimento 100x. Le immagini dei neuroni e degli astrociti venivano prese ad un ingrandimento 100x e processate con ImageJ Software, NIH.

5.7 Preparazione di lisati cellulari

Le cellule venivano lavate con PBS, staccate con uno scraper, centrifugate a 8000 x g per 5 minuti e poi lisate in 25-50 μ l di lysis buffer (100 mM Tris pH 7.6, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% NP40) contenente un cocktail di inibitori di proteasi (complete Mini; Roche).

Dopo 20 minuti di incubazione a 4°C i lisati venivano centrifugati a 10000 x g per 10 minuti a 4°C. Il sopranatante così ottenuto costituisce l'estratto totale di proteine. Un'aliquota del campione viene prelevata per la determinazione della concentrazione proteica con il metodo di Bradford (Bio-Rad). I campioni venivano infine congelati a -80°C fino al loro utilizzo.

5.8 Western Blot

Separazione elettroforetica. I campioni venivano separati in base alla massa molecolare mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (10%) in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). Quantità predeterminate di ciascun lisato (20-40 μ g di proteine per lane) venivano diluite in un tampone di caricamento (40 mM Tris pH 6.8, glicerolo 6% vol/vol, β -mercaptoetanololo 1.25% vol/vol, SDS 1% w/vol,

blu di bromofenolo), bollite per 5 minuti a 100°C e, così denaturate, caricate nel gel, immerso nel tampone di corsa (glicina 14.5 g/l, Tris 3 g/l, SDS 1 g/l).

L'apparato usato per la corsa elettroforetica era il mini-PROTEAN 3[®] Cell (Bio-Rad).

Elettroblotting. Utilizzando gli appositi sostegni (Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) si assemblava un "sandwich" costituito dal gel di poliacrilammide e da una membrana di nitrocellulosa (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech) perfettamente aderenti, posti tra 8 foglietti di carta da filtro e due spugnette, precedentemente imbevuti nel tampone di trasferimento (glicina 14.5 g/l, Tris 3 g/l, SDS 1 g/l, metanolo 20% vol/vol). L'assemblato veniva inserito in una camera di corsa contenente il tampone di trasferimento e, applicando un voltaggio di 65 Volt per 90 minuti, si otteneva il trasferimento e l'ancoraggio delle proteine al filtro di nitrocellulosa.

Al termine del processo si controllava l'avvenuto trasferimento delle proteine immergendo per 3 minuti la membrana in una soluzione di rosso Ponceau (polvere Ponceau S 20 mg/ml, acido tricloroacetico 30 mg/ml, acido sulfosalicilico 30 mg/ml) che colorava in modo reversibile tutte le proteine.

Rivelazione della proteina di interesse con un sistema immunoenzimatico. La membrana di nitrocellulosa del blotting veniva incubata per 60 minuti, in blanda agitazione, in una soluzione di quenching contenente 5% latte (w/vol) in TBS-tween (20 mM Tris pH 7.4, NaCl 200 mM, tween-20 0.1% vol/vol). Questo passaggio aveva lo scopo di saturare con le proteine del latte tutti i siti del filtro non occupati dalle proteine durante il blotting e di favorire così il riconoscimento della banda della proteina d'interesse da parte dell'anticorpo.

Dopo lavaggio con tampone TBS-tween, il filtro veniva incubato con l'anticorpo primario nella soluzione di quenching per almeno 18 ore a 4°C. Quindi, per eliminare l'eccesso di anticorpo primario, si effettuavano tre lavaggi del filtro con tampone TBS-tween e il filtro veniva poi incubato per due ore, in agitazione, con l'anticorpo secondario anti-rabbit (1:10000) o anti-mouse (1:3000) coniugato all'enzima perossidasi (Amersham Pharmacia Biotech), diluito nella soluzione di quenching. L'eccesso di anticorpo secondario veniva eliminato con tre lavaggi con TBS-tween. Infine si immergeva il filtro per 5 minuti in una soluzione ottenuta da un kit commerciale (ECL, Millipore) contenente il

substrato della perossidasi coniugata all'anticorpo secondario: ne derivava un'emissione luminosa che impressionava una pellicola fotosensibile e rivelava la presenza della proteina d'interesse.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-IGF1-R policlonale (rabbit, 1:1000, Cell Signaling), anti-GFAP monoclonale (mouse, 1:5000, Chemicon) e anti-Actina, monoclonale (mouse, 1:10000, Sigma).

L'intensità ottica della banda delle proteine IGF1-R e GFAP veniva determinata con un GS-710 densitometer (Bio-Rad) utilizzando il Quantity One Software (Bio-Rad) e poi normalizzata con quella dell'actina.

Stripping. In alcuni esperimenti, le membrane di nitrocellulosa venivano "strippate" per togliere tutti gli anticorpi e poter così procedere con una nuova incubazione. Le membrane venivano tenute nella soluzione di stripping (β -mercaptoetanololo 100 mM, SDS 2%, 62.5 mM TRIS pH 6.8) per 30 min a 50°C in agitazione. In seguito le membrane venivano lavate con TBS-tween e dopo quenching con 5% latte in TBS-tween si procedeva all'incubazione con l'anticorpo primario come riportato sopra.

5.9 Analisi statistica

I valori ottenuti sono riportati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata verificata mediante il T-test per il confronto a coppie e mediante l'analisi della varianza ANOVA, seguita quando richiesto dal test post hoc di Bonferroni.

RISULTATI

6.1 Espressione di IGF1-R nelle colture neuronali primarie di ratto durante la senescenza *in vitro*

L'evidenza del ruolo di IGF1-R nell'incremento della produzione di A β nel cervello durante l'invecchiamento (33), ci ha portato a studiare la regolazione dell'espressione di IGF1-R nei neuroni durante la senescenza. In questo lavoro abbiamo utilizzato colture neuronali primarie a lungo termine come modello di invecchiamento cerebrale. Le colture sono state preparate come descritto in materiali e metodi. Le cellule sono poi state lisate a tempi differenti (3, 6, 12, 18 e 24 giorni), e l'espressione di IGF1-R è stata analizzata mediante Western Blot come mostrato in *Fig.15*.

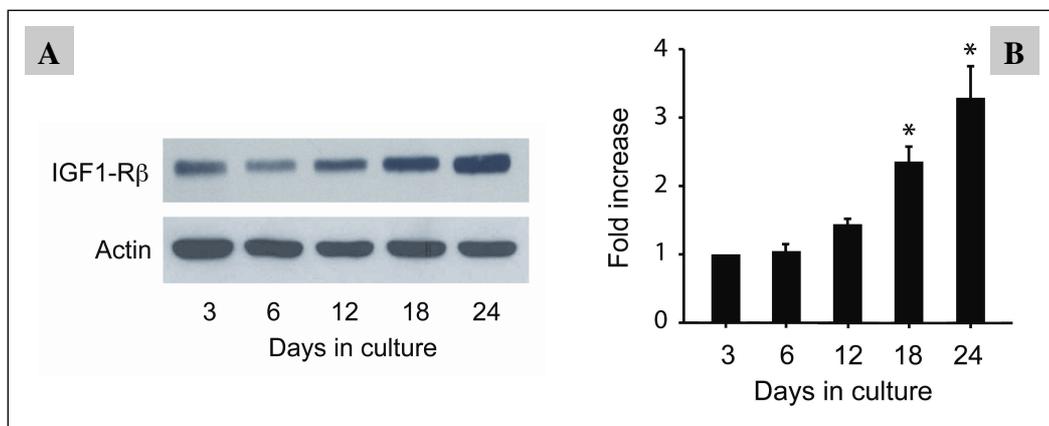


Fig. 15 - **A**: Analisi in Western Blot dell'espressione di IGF1-R in colture neuronali corticali primarie di ratto a diversi giorni di coltura. **B**: Analisi densitometrica dell'intensità delle bande di IGF1-R relativa all'actina e normalizzata a quella di IGF1-R di colture neuronali di 3 giorni. I dati sono medie \pm SEM ($n=5$). * $p<0.001$ vs. 3 giorni (ANOVA seguita dal test post hoc di Bonferroni).

I risultati hanno dimostrato che l'espressione di IGF1-R aumentava con l'invecchiamento della coltura, confermando i dati presenti in letteratura ottenuti in neuroni primari di topo (33).

Le colture sono state poi caratterizzate mediante immunofluorescenza con anticorpi che riconoscono marcatori specifici neuronali (MAP2) e gliali (GFAP, CD11b).

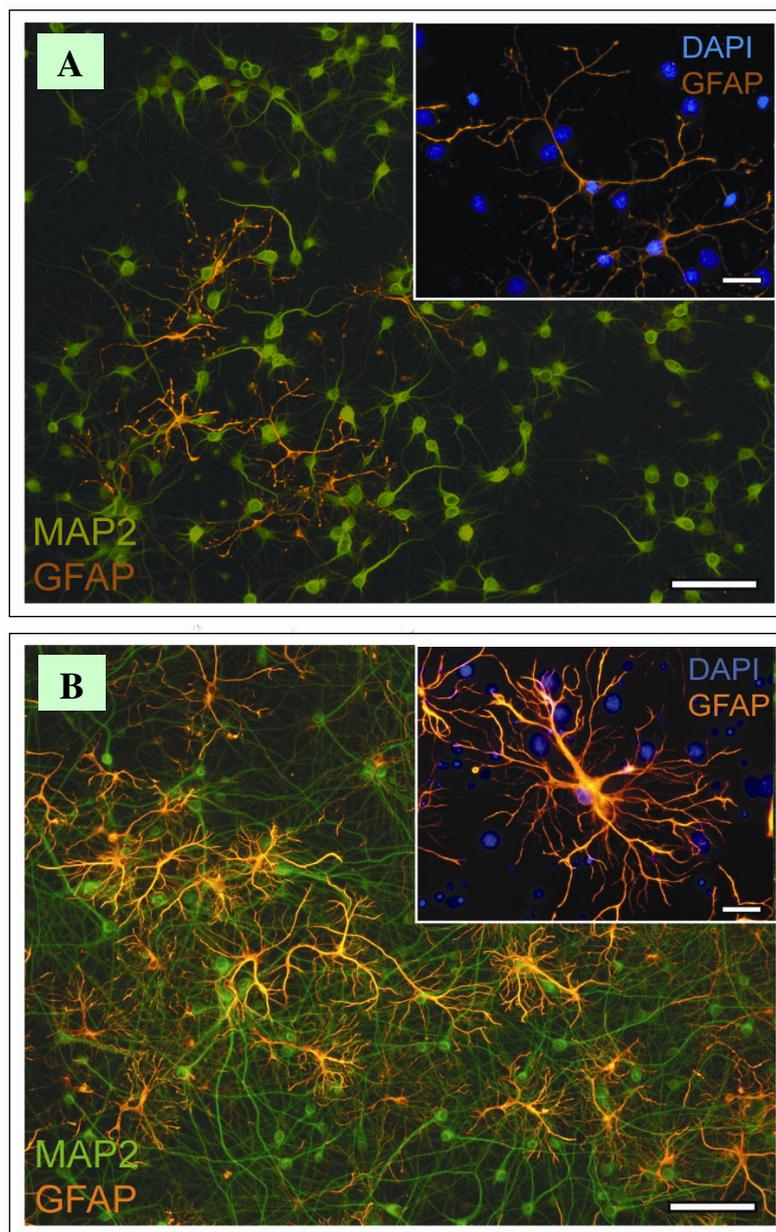


Fig. 16 - Immagini di immunofluorescenza, acquisite al microscopio a fluorescenza, di colture neuronali corticali primarie di ratto a 3 (**A**) e 24 (**B**) giorni di coltura. Le cellule sono state evidenziate con anticorpo anti MAP2 (verde) per i neuroni e con anticorpo anti GFAP (rosso) per gli astrociti. Scale bars 100 μ m. L'insero nelle foto mostra, ad alta risoluzione, astrociti evidenziati con anticorpo anti GFAP e nuclei evidenziati con DAPI (blu) a 3 (**A**) e 24 (**B**) giorni di coltura. Scale bars 25 μ m.

Nelle colture neuronali appena isolate (3 giorni), la presenza di astrociti, era bassa (vedi Fig. 16a), mentre nelle colture invecchiate (24 giorni) (vedi Fig. 16b) il numero degli astrociti aumentava in modo consistente.

Il numero degli astrociti, calcolato rispetto a quello dei neuroni, a differenti giorni di coltura, mostrava un incremento che variava dal 5-7% a 3 giorni, fino a raggiungere un valore plateau di 35-40% a 12 giorni, come mostrato in Fig. 17.

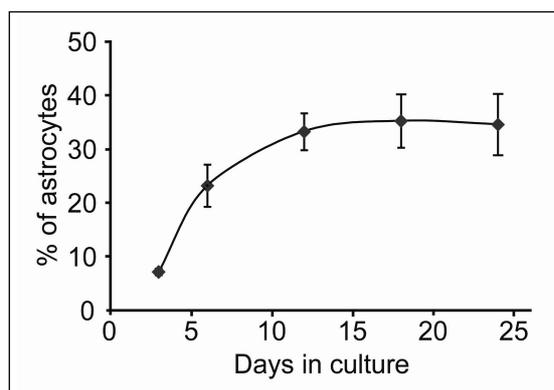


Fig. 17 - Percentuale di astrociti relativa al numero di neuroni, presenti in colture neuronali corticali primarie di ratto, a differenti giorni di coltura. Per l'analisi sono state utilizzate colture neuronali corticali primarie di ratto evidenziate con anticorpo anti MAP2 (verde) per i neuroni e con anticorpo anti GFAP (rosso) per gli astrociti mentre i nuclei sono stati evidenziati con DAPI (blu) e con il calcolo del numero relativo di cellule GFAP-positive in un minimo di dieci campioni per ogni tempo. I dati sono medie \pm SEM (n=4).

Nonostante la percentuale degli astrociti rimanesse costante dopo 12 giorni di coltura, l'analisi in Western Blot della proteina marcatore degli astrociti, GFAP, mostrava un forte aumento a 18-24 giorni (Fig. 18).

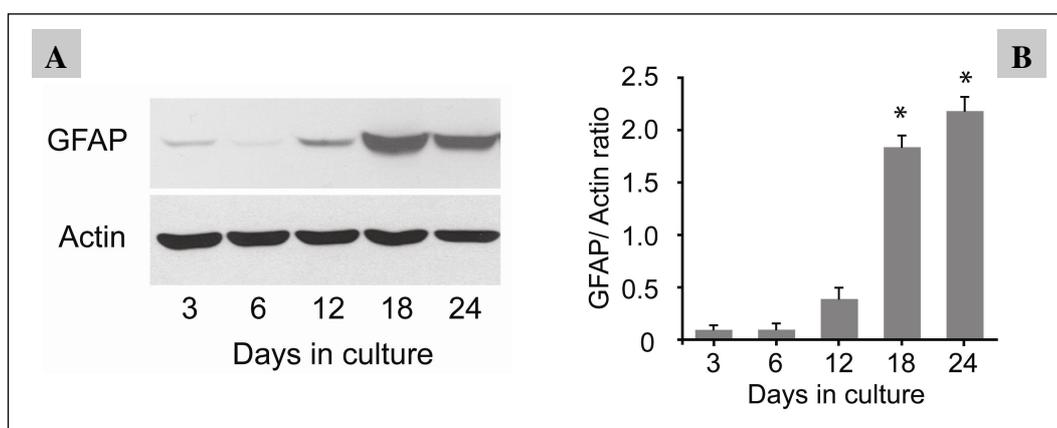


Fig. 18 - **A**: Analisi in Western Blot dell'espressione di GFAP in colture neuronali corticali primarie di ratto a diversi giorni di coltura. **B**: Analisi densitometrica dell'intensità delle bande di GFAP relativa all'actina. I dati sono medie \pm SEM (n=5). * $p < 0.001$ vs. 3 giorni (ANOVA seguita dal test post hoc di Bonferroni).

Questo risultato indicava che gli astrociti, dopo aver smesso di dividersi, maturavano e diventavano ipertrofici. Ciò è in accordo con le osservazioni condotte al microscopio a fluorescenza che hanno rivelato un aumento sia nel numero (*Fig. 16b*) che nelle dimensioni dei loro processi cellulari (*Fig. 19*).

In nessun tempo della coltura è stata osservata la presenza di cellule microgliali.

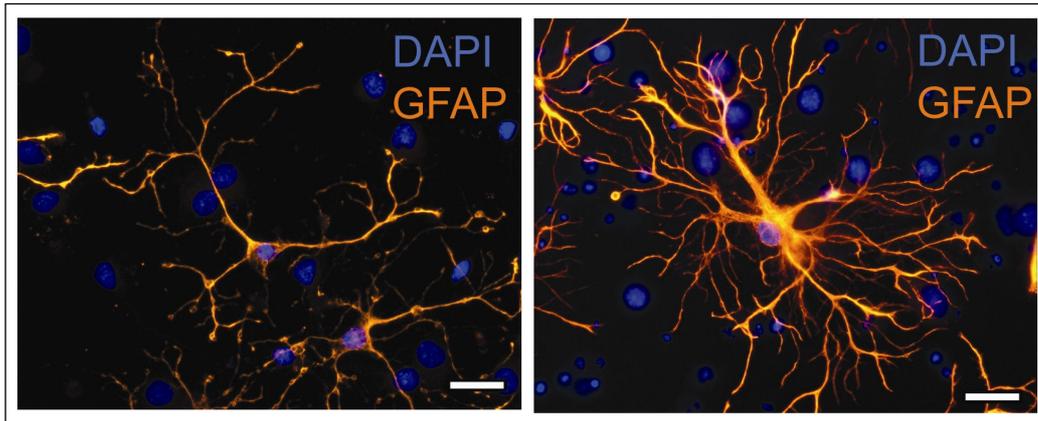


Fig. 19 - Immagini di immunofluorescenza, acquisite al microscopio a fluorescenza, di astrociti presenti in colture neuronali corticali primarie di ratto a 3 (**pannello di sx**) e 24 (**pannello di dx**) giorni di coltura. Le cellule sono state evidenziate con anticorpo anti GFAP (rosso) per gli astrociti ed i nuclei evidenziati con DAPI (blu). Scale bars 25 μ m.

Questi risultati indicano quindi che l'incremento nell'espressione di IGF1-R, avveniva in parallelo ad una modificazione nella composizione della coltura cellulare (*diverso rapporto astrociti/neuroni*) indicando che questi due aspetti, aumento astrocitario e incremento dell'espressione di IGF1-R, fossero correlati.

Allo scopo di escludere che la proliferazione e l'ipertrofia degli astrociti fossero responsabili dell'aumentata espressione di IGF1-R durante la senescenza, abbiamo analizzato il livello di espressione del recettore in colture neuronali trattate con cytosine arabinoside (Ara-C), un inibitore della proliferazione gliale. Dopo 4 giorni dalla semina, le colture neuronali venivano trattate con 2.5 μ M Ara-C per 48 ore. Il terreno era poi sostituito con terreno fresco per togliere l'inibitore. Il trattamento con Ara-C aboliva completamente la proliferazione degli astrociti, come rivelato dall'osservazione delle cellule al microscopio a fluorescenza (*Fig. 20*).

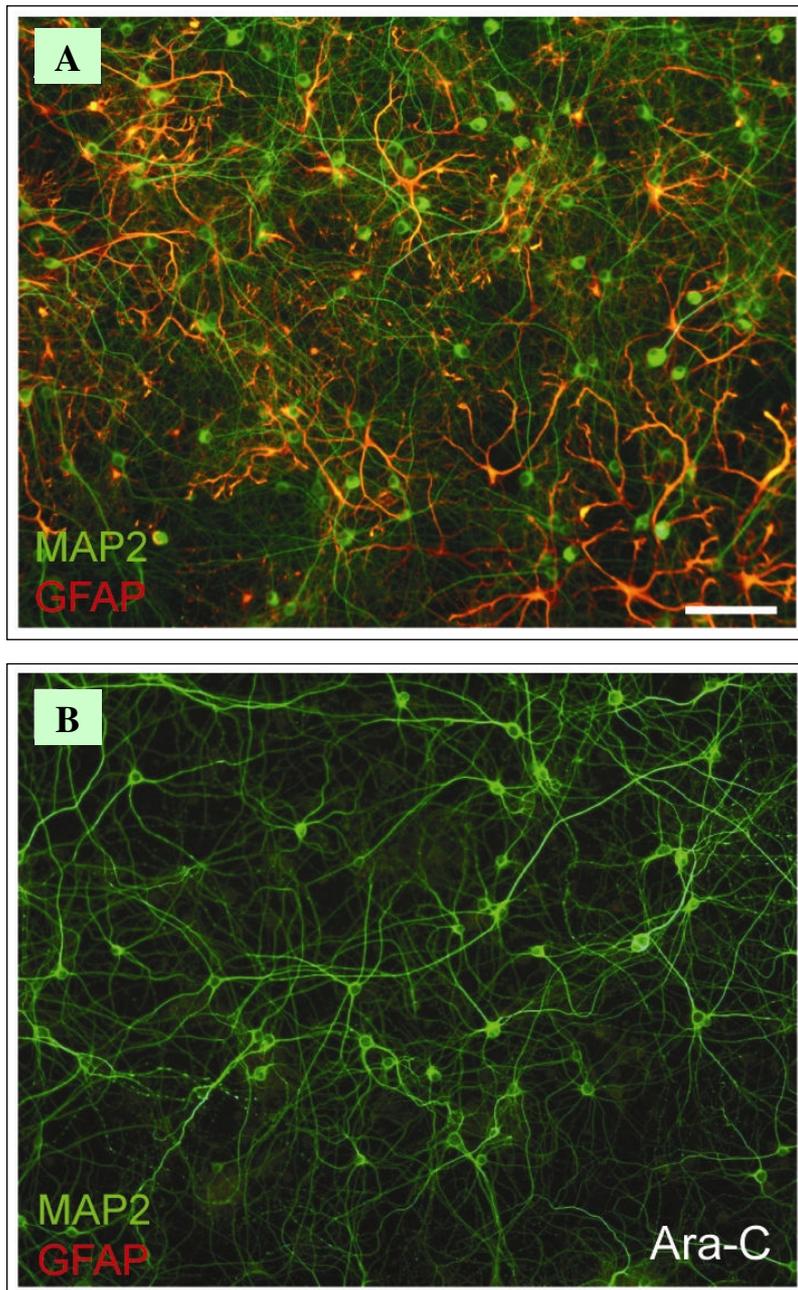


Fig. 20 - Immagini di immunofluorescenza, acquisite al microscopio a fluorescenza, di colture neuronali corticali primarie di ratto di 24 giorni non trattate (**A**) e trattate (**B**) con ARA-C. Le cellule sono state evidenziate con anticorpo anti MAP2 (verde) per i neuroni e con anticorpo anti GFAP (rosso) per gli astrociti. Scale bars 100 μ m.

L'analisi del recettore in Western Blot ha dimostrato che in assenza di astrociti l'espressione di IGF1-R era marcatamente diminuita e non aumentava durante la senescenza (Fig. 21).

Questi dati dimostrano che l'aumento nell'espressione di IGF1-R nelle colture neuronali dipende dalla presenza di astrociti.

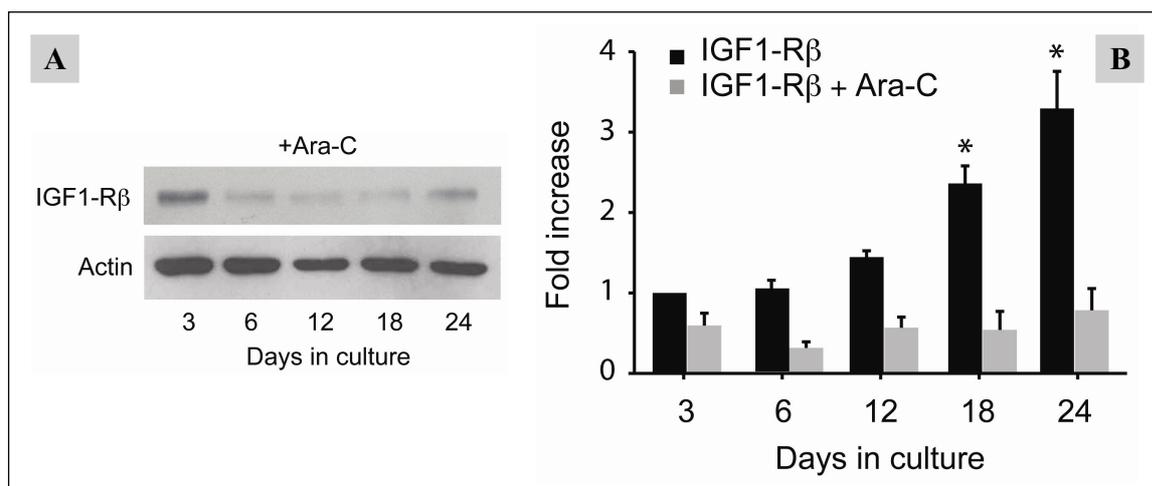


Fig. 21 - **A**: Analisi in Western Blot dell'espressione di IGF1-R in colture neuronali corticali primarie di ratto a diversi giorni di coltura, trattate con ARA-C. **B**: Analisi densitometrica dell'intensità delle bande di IGF1-R (di colture neuronali trattate e non trattate con ARA-C) relativa all'actina e normalizzata a quella di IGF1-R di colture neuronali di 3 giorni non trattate con ARA-C. I dati sono medie \pm SEM ($n=5$). * $p<0.001$ vs. 3 giorni (ANOVA seguita dal test post hoc di Bonferroni).

6.2 Localizzazione di IGF1-R nelle colture neuronali a lungo termine

I risultati ottenuti ci hanno fatto ipotizzare che:

1. il recettore fosse espresso sugli astrociti oltre che sui neuroni e che la sua sovraespressione osservata nelle colture invecchiate, fosse dovuta ad un aumento del numero degli astrociti;
2. oppure che la presenza degli astrociti fosse necessaria per la up-regolazione del recettore a livello neuronale.

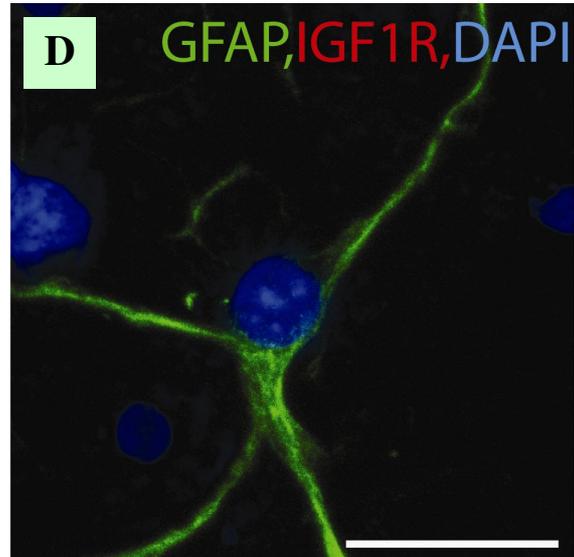
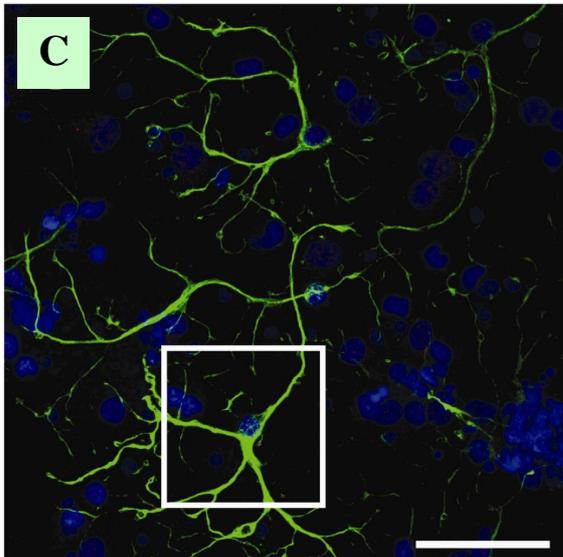
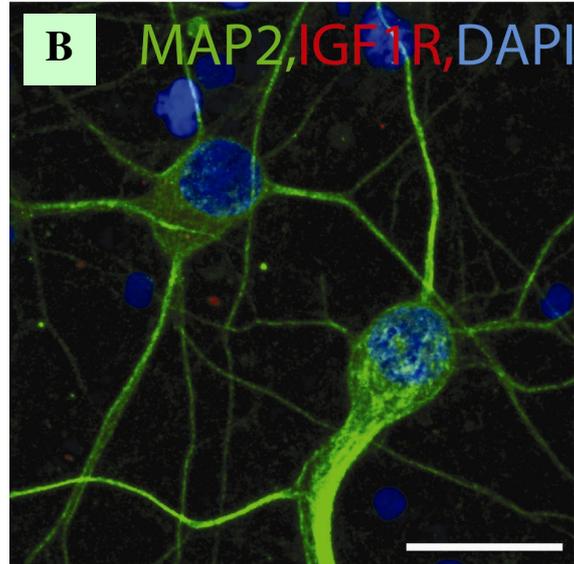
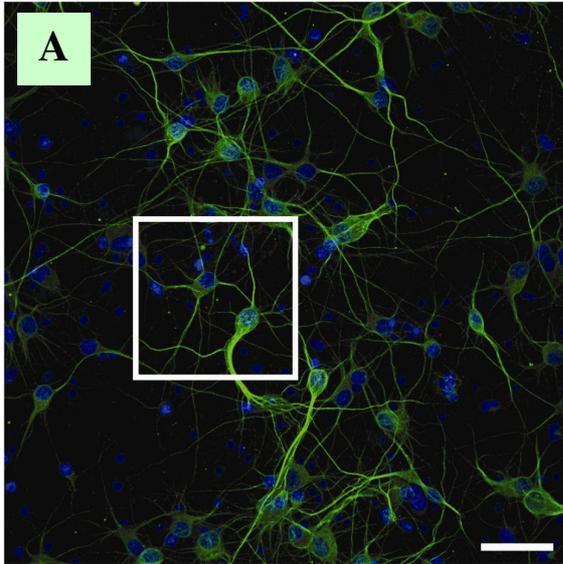
Per indagare quale delle due ipotesi fosse corretta, abbiamo osservato mediante immunofluorescenza, su quale tipo di cellule fosse espresso il recettore.

Abbiamo analizzato l'espressione del recettore in colture corticali miste sia di 3 giorni che di 24 giorni. Le cellule venivano incubate con un anti-IGF1-R e con un anticorpo specifico per neuroni o astrociti:

- **IGF1-R e MAP2** per esaminare i soli neuroni;
- **IGF1-R e GFAP** per esaminare i soli astrociti;
- i nuclei venivano colorati con **DAPI**.

Come mostrato in *Fig. 22* IGF1-R è presente principalmente nelle cellule MAP2 positive a 24 giorni (*Fig. 22e,f*), ma non a 3 giorni (*Fig. 22a,b*), con una colorazione puntiforme localizzata soprattutto nel soma. Al contrario la colorazione di IGF1-R nelle cellule GFAP positive appariva debole sia a 3 che a 24 giorni (*Fig. 22c,d e Fig. 22g,h*).

3 DAYS



24 DAYS

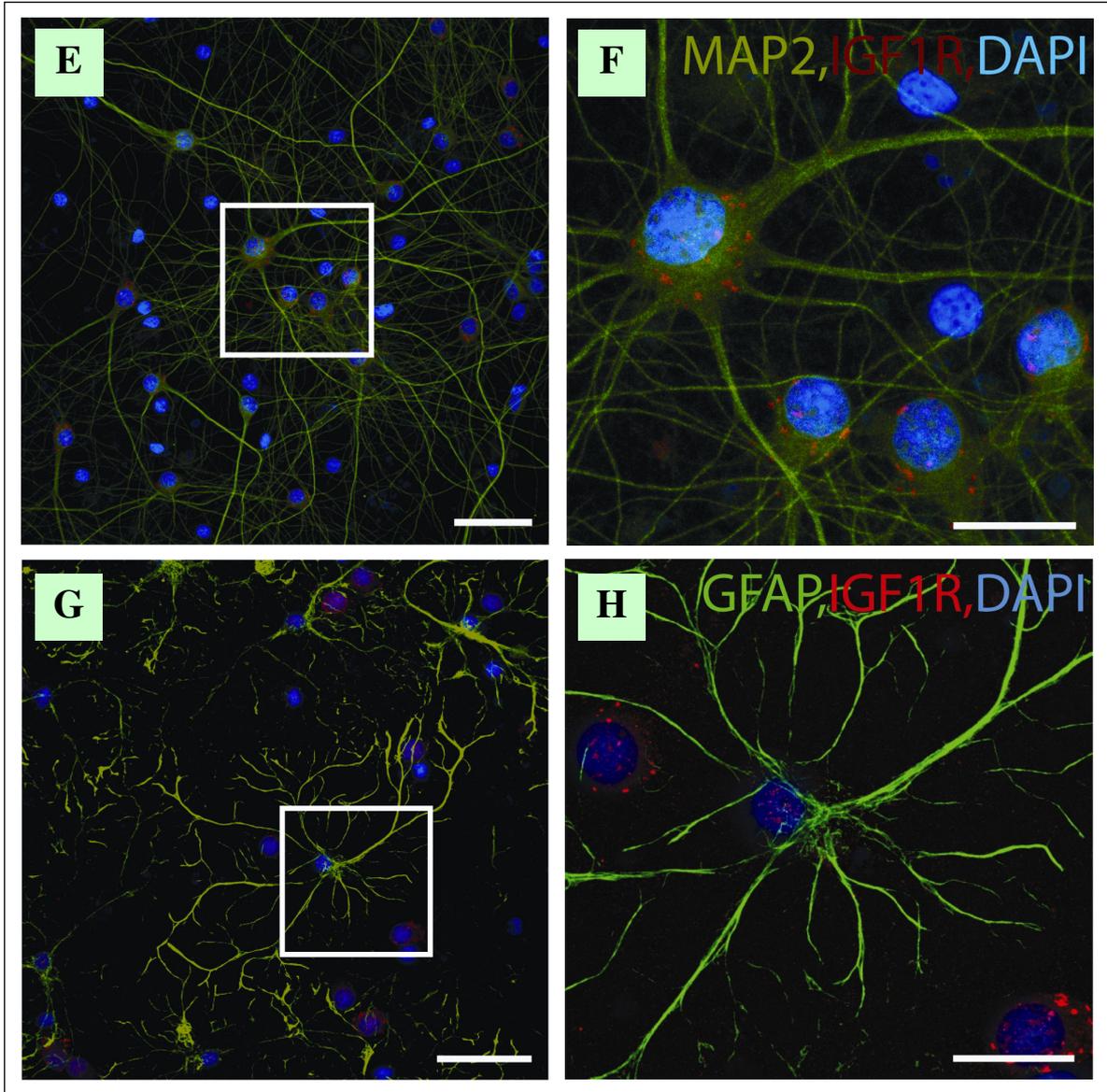


Fig. 22 - Immagini di immunofluorescenza, acquisite al microscopio confocale, di colture neuronali corticali primarie di ratto a 3 (A, B, C, D) e 24 (E, F, G, H) giorni di coltura. Le cellule sono state evidenziate con anticorpo anti IGF1-R (rosso) per il recettore e anticorpo anti MAP2 (verde) per i neuroni (A, B, E, F) o con anticorpo anti IGF1-R (rosso) per il recettore e anticorpo anti GFAP (verde) per gli astrociti (C, D, G, H). I nuclei sono stati evidenziati con DAPI (blu). Le immagini B, D, F, H mostrano, ad alta risoluzione, il riquadro all'interno delle foto A, C, E, G. Scale bars 50 μm in A, C, E, G e 20 μm in B, D, F, H.

Queste osservazioni indicano che l'incremento nell'espressione di IGF1-R nelle colture corticali miste durante l'invecchiamento, osservato in Western Blot (*Fig. 15*), è principalmente dovuto ad una aumentata espressione del recettore sui neuroni.

L'espressione di IGF1-R è stata valutata in immunofluorescenza anche sui neuroni, precedentemente trattati con Ara-C, dopo 24 giorni di coltura, come mostrato in *Fig. 23*.

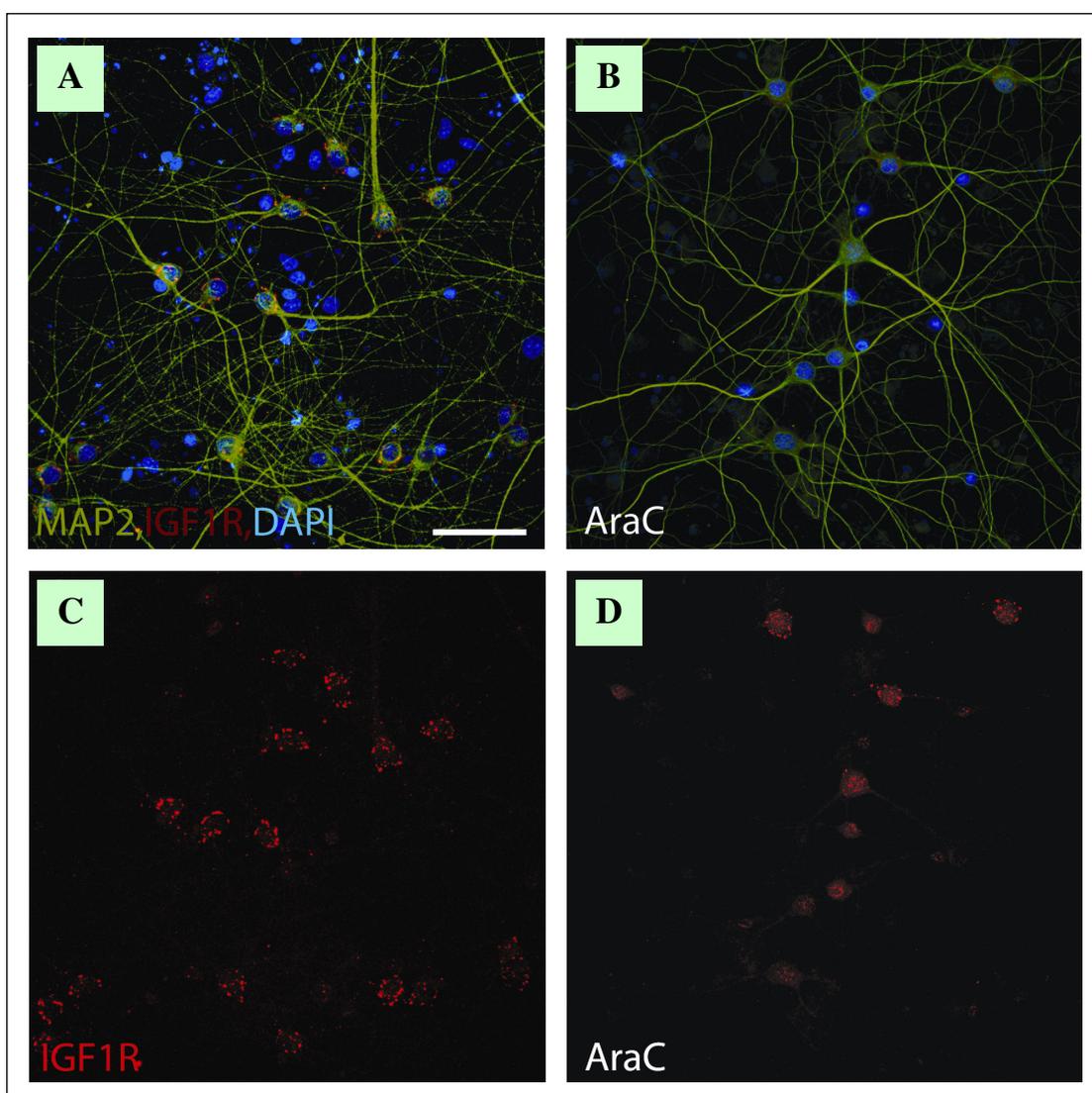


Fig. 23 - Immagini di immunofluorescenza, acquisite al microscopio confocale, di colture neuronali corticali primarie di ratto di 24 giorni non trattate (**A, C**) e trattate (**B, D**) con Ara-C. Le cellule sono state evidenziate con anticorpo anti IGF1-R (rosso) per il recettore e anticorpo anti MAP2 (verde) per i neuroni ed i nuclei sono stati evidenziati con DAPI (blu) (**A, B**) o solo con anticorpo anti IGF1-R (rosso) per il recettore (**C, D**). Scale bars 40 μm.

Dal confronto tra le colture neuronali non trattate (*Fig. 23a,c*) con le colture neuronali trattate (*Fig. 23b,d*) con Ara-C, si è osservato che nei neuroni trattati con Ara-C il segnale di IGF1-R era di intensità minore.

Questi dati sono a conferma che la ridotta espressione di IGF1-R riscontrata negli esperimenti condotti con Western Blot, in colture neuronali trattate con Ara-C (*vedi Fig. 21a*), non era dovuta ad una perdita di cellule gliali esprimenti IGF1-R, ma ad una diminuita espressione del recettore sui singoli neuroni.

Questi risultati hanno quindi dimostrato che il recettore è espresso sui neuroni e non sugli astrociti e che la presenza di questi ultimi risulta essere necessaria per l'espressione neuronale di IGF1-R.

Un'ulteriore conferma ci è stata data dall'analisi mediante Western Blot dell'espressione di IGF1-R negli astrociti primari puri.

In accordo con precedenti osservazioni (36) gli astrociti cresciuti in assenza di neuroni, esprimono un'isoforma di IGF1-R con un peso molecolare diverso (*Fig. 24 lanes 3 e 4*) leggermente superiore a quello delle colture neuronali pure (*Fig. 24 lane 1*) o delle colture neuronali miste in cui sono presenti gli astrociti (*Fig. 24 lane 2*).

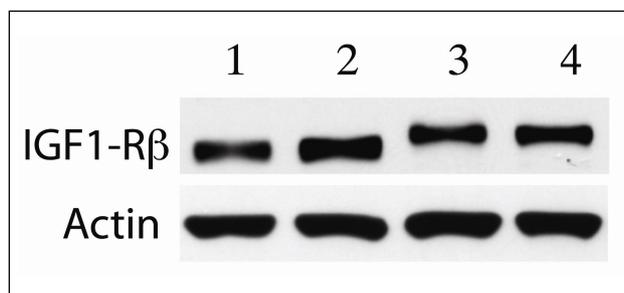


Fig. 24 - Analisi in Western Blot dell'espressione di IGF1-R in colture di neuroni corticali primari puri di ratto a 24 giorni trattati con Ara-C (*lane 1*), in colture neuronali corticali primarie di ratto di 24 giorni (*lane 2*) e in colture di astrociti corticali puri di ratto a 3 (*lane 3*) e 24 (*lane 4*) giorni, cresciuti in Neurobasal medium addizionato con B27.

L'assenza di questa isoforma nelle colture miste (*Fig. 24 lane 2*) conferma che il recettore è espresso solo sui neuroni, indicando che nelle nostre condizioni sperimentali i neuroni potrebbero inibire l'espressione di IGF1-R sugli astrociti.

Questa ipotesi è supportata dall'analisi del recettore in immunofluorescenza che mostra una evidente espressione di IGF1-R a livello nucleare (Fig. 25) negli astrociti primari.

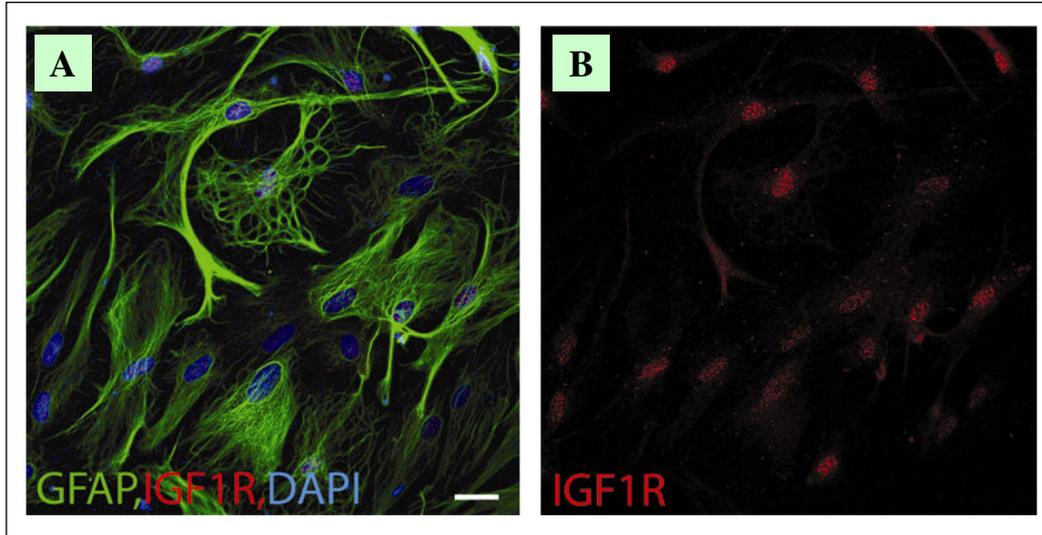


Fig. 25 - Immagini di immunofluorescenza, acquisite al microscopio confocale, di colture di astrociti corticali puri di ratto. Le cellule sono state evidenziate con anticorpo anti IGF1-R (rosso) per il recettore e anticorpo anti GFAP (verde) per gli astrociti ed i nuclei sono stati evidenziati con DAPI (blu) (A) o solo con anticorpo anti IGF1-R (rosso) per il recettore (B). Gli astrociti prima della colorazione sono stati mantenuti in coltura in Neurobasal medium addizionato con B27 per 24 giorni. Scale bars 25 μ m.

6.3 Ruolo degli astrociti nella regolazione dell'espressione di IGF1-R nei neuroni

Il fatto che gli astrociti sono necessari per incrementare l'espressione di IGF1-R nei neuroni, ci ha portato ad investigare quale fosse il loro meccanismo d'azione.

È noto che gli astrociti possono comunicare con i neuroni (*cross-talk*) sia attraverso il contatto fisico (*cell-to-cell*) che attraverso il rilascio di fattori solubili (37).

Per discriminare tra queste due possibilità, abbiamo allestito delle co-culture di neuroni puri e di astrociti puri, separati da un trans-well che permette il passaggio di fattori solubili veicolati dal terreno di crescita attraverso i fori del trans-well stesso. I neuroni puri sono stati ottenuti dopo trattamento delle colture con Ara-C,

gli astrociti primari puri sono invece stati isolati da una coltura gliale mista e seminati sopra i trans-well in numero pari al 5-10 % rispetto a quello dei neuroni. Dopo 15 giorni di co-coltura i neuroni sono stati lisati e l'espressione di IGF1-R è stata analizzata mediante Western Blot come rappresentato in Fig. 26. In parallelo abbiamo analizzato l'espressione di IGF1-R in una coltura neuronale mista dopo gli stessi giorni (controllo).

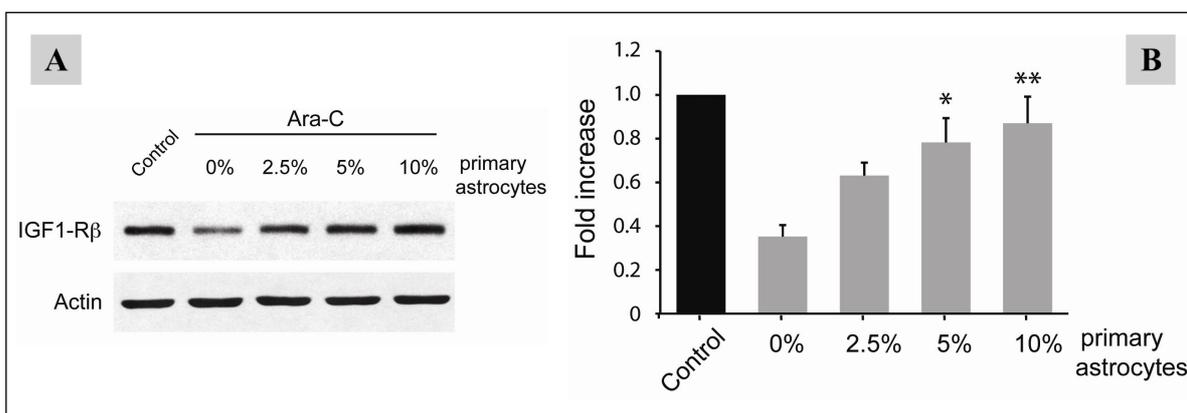


Fig. 26 - **A**: Analisi in Western Blot dell'espressione di IGF1-R in colture di neuroni corticali primari puri di ratto (trattate con Ara-C) dopo 15 giorni di co-coltura con differenti percentuali di astrociti corticali puri di ratto seminati su trans-well. Come confronto è stata analizzata l'espressione di IGF1-R in colture neuronali corticali primarie di ratto (controllo). **B**: Analisi densitometrica dell'intensità delle bande di IGF1-R relativa all'actina e normalizzata a quella di IGF1-R del controllo. I dati sono medie \pm SEM (n=4). * $p < 0.001$ vs. 0% Ara-C. (ANOVA seguita dal test post hoc di Bonferroni).

I risultati hanno dimostrato che il livello di espressione di IGF1-R nei neuroni puri aumenta dopo co-coltura con gli astrociti, in modo dipendente dalla quantità degli astrociti presenti sul trans-well.

Questo indica che il meccanismo d'azione con cui gli astrociti modulano l'espressione di IGF1-R è indipendente dal contatto fisico, ma dipende da fattori solubili rilasciati dagli stessi astrociti.

A questo punto abbiamo pensato che se i fattori solubili rilasciati dagli astrociti erano coinvolti nella regolazione dell'espressione di IGF1-R nei neuroni, essi si sarebbero dovuti accumulare durante la senescenza *in vitro*, ed essere presenti ad alti livelli nel terreno di coltura quando l'espressione del recettore era alta, cioè a 24 giorni.

Per verificare queste ipotesi abbiamo raccolto il terreno condizionato (CM, conditioned medium-terreno di crescita condizionato) di una coltura mista a 3 e a

24 giorni, e lo abbiamo aggiunto a colture cellulari di 3 giorni, sia miste che trattate con Ara-C, in accordo con il protocollo sperimentale descritto in Fig. 27.

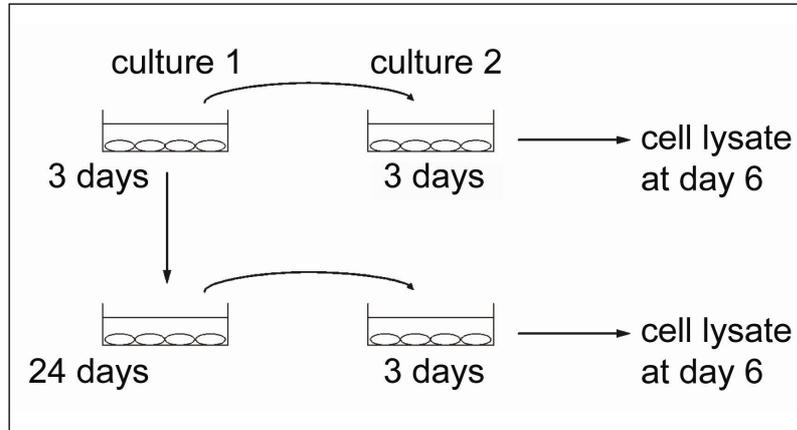


Fig. 27 - Protocollo sperimentale: il terreno di crescita condizionato di colture miste di 3 e di 24 giorni viene raccolto e aggiunto a colture cellulari di 3 giorni, sia miste che trattate con Ara-C. Le cellule vengono trattate per 3 giorni e in seguito lisate (6 giorni dopo la semina) come descritto in materiali e metodi.

Dopo 3 giorni di trattamento (i.e. 6 giorni di crescita cellulare) abbiamo analizzato mediante Western Blot l'espressione di IGF1-R nelle diverse colture (Fig. 28).

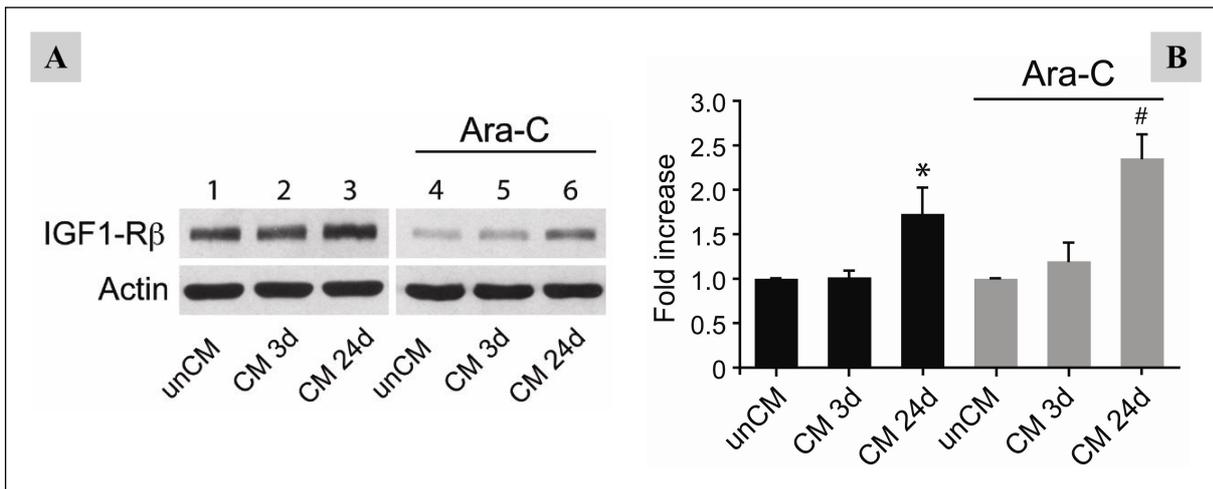


Fig. 28 - **A**: Analisi in Western Blot dell'espressione di IGF1-R in colture di neuroni corticali primari puri di ratto non trattate (prime 3 lanes di sinistra) e trattate (seconde 3 lanes di destra) precedentemente con Ara-C, dopo 3 giorni di trattamento con: un terreno di crescita fresco non condizionato (lanes 1 e 4); con un terreno di crescita condizionato di colture miste di 3 giorni (lanes 2 e 5); con un terreno di crescita condizionato di colture miste di 24 giorni (lanes 3 e 6). **B**: Analisi densitometrica dell'intensità delle bande di IGF1-R relativa all'actina e normalizzata a quella di IGF1-R delle colture trattate con terreno fresco non condizionato. I dati sono medie \pm SEM (n=6). * $p < 0.05$ vs. CM 3 giorni nelle colture neuronali non trattate con Ara-C. # $p < 0.01$ (n=5) vs. CM 3 giorni nelle colture neuronali trattate con Ara-C. (ANOVA seguita dal test post hoc di Bonferroni).

I risultati, a sostegno della nostra ipotesi, hanno dimostrato che l'espressione di IGF1-R aumentava significativamente sia nelle colture miste che in quelle di neuroni puri dopo l'aggiunta del terreno condizionato di 24 giorni (CM 24d) mentre rimaneva allo stesso livello dopo l'aggiunta di un terreno condizionato di 3 giorni (CM 3d) o di terreno fresco non condizionato (unCM) come illustrato in *Fig. 28*.

Per confermare ulteriormente i risultati ottenuti, abbiamo condotto successivi esperimenti utilizzando il terreno condizionato raccolto da una coltura di astrociti puri mantenuti per 7 giorni in Neurobasal medium contenente B27. Il terreno veniva aggiunto ad una coltura di neuroni puri e dopo 3-5 giorni di trattamento l'espressione di IGF1-R veniva analizzata mediante Western Blot. I risultati hanno dimostrato che il terreno condizionato dagli astrociti induceva un significativo aumento di IGF1-R nei neuroni (*Fig. 29*).

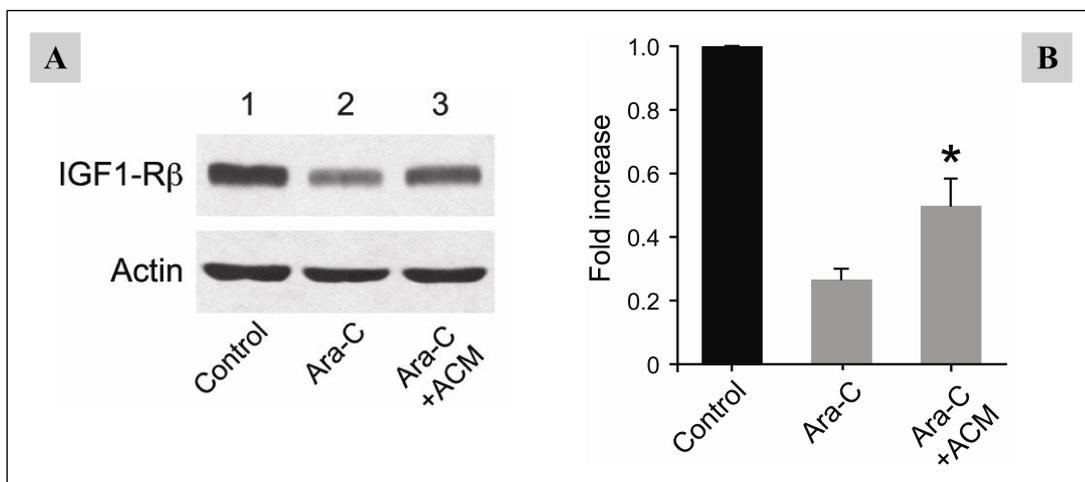


Fig. 29 - **A:** Analisi in Western Blot dell'espressione di IGF1-R in colture di neuroni corticali primari di ratto utilizzato come controllo (lane 1); in colture di neuroni corticali primari puri di ratto trattate con Ara-C (lane 2); in colture di neuroni corticali primari puri di ratto precedentemente trattate con Ara-C e successivamente trattate per 3 giorni con il terreno di crescita condizionato di colture di astrociti puri, mantenuti per 7 giorni in Neurobasal medium addizionato con B27 (lane 3). **B:** Analisi densitometrica dell'intensità delle bande di IGF1-R relativa all'actina e normalizzata a quella di IGF1-R del controllo. I dati sono medie \pm SEM ($n=7$). * $p<0.01$ vs. Ara-C.

Tutti questi dati dimostrano quindi che gli astrociti rilasciano dei fattori solubili in grado di up-regolare l'espressione di IGF1-R nei neuroni.

6.4 I mediatori del cross-talk tra neuroni e astrociti

Allo scopo di avere indicazioni circa il peso molecolare dei fattori solubili che modulano l'espressione di IGF1-R, abbiamo caricato su una colonna per gel filtrazione il CM di una coltura mista di 24 giorni. Le frazioni eluite da 160 a 280 ml che corrispondono a proteine con un peso molecolare compreso tra 225000 e 3000 Da sono state raccolte e concentrate. Abbiamo poi trattato per 3 giorni colture di neuroni puri con ciascuna di queste frazioni.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che nessuna di queste frazioni era in grado di indurre un aumento di IGF1-R (dato non mostrato), indicando così che i fattori solubili attivi potessero avere un peso molecolare inferiore a 3000 Da.

Per questo abbiamo proceduto con un diverso approccio sperimentale in cui il CM di una coltura mista di 24 giorni veniva filtrato attraverso un concentratore Amicon Ultra-3. Tale concentratore ha permesso di separare i componenti con peso molecolare inferiore a 3000 Da dalla restante parte della miscela.

Allo scopo di definire se l'aumentata espressione di IGF1-R fosse dovuta ad un fattore con peso molecolare inferiore a 3000 Da, una coltura di neuroni puri è stata trattata per 3 giorni sia con il filtrato che con il trattenuto.

Come mostrato in *Fig. 30a (lane 4) e b* il filtrato era il solo in grado di aumentare l'espressione di IGF1-R nei neuroni. Questo indica che l'espressione di IGF1-R viene up-regolata dagli astrociti attraverso molecole con un peso molecolare inferiore ai 3000 Da.

In parallelo le cellule venivano trattate con il filtrato (*Fig. 30a lane 6*) e il trattenuto (*Fig. 30a lane 5*) dell'unCM, questo trattamento non induceva alcuna modificazione nei livelli del recettore.

Nell'analisi in Western Blot è stata anche esaminata l'espressione di IGF1-R nei neuroni trattati con un CM di 24 giorni prima della filtrazione (*Fig. 30a lane 2*).

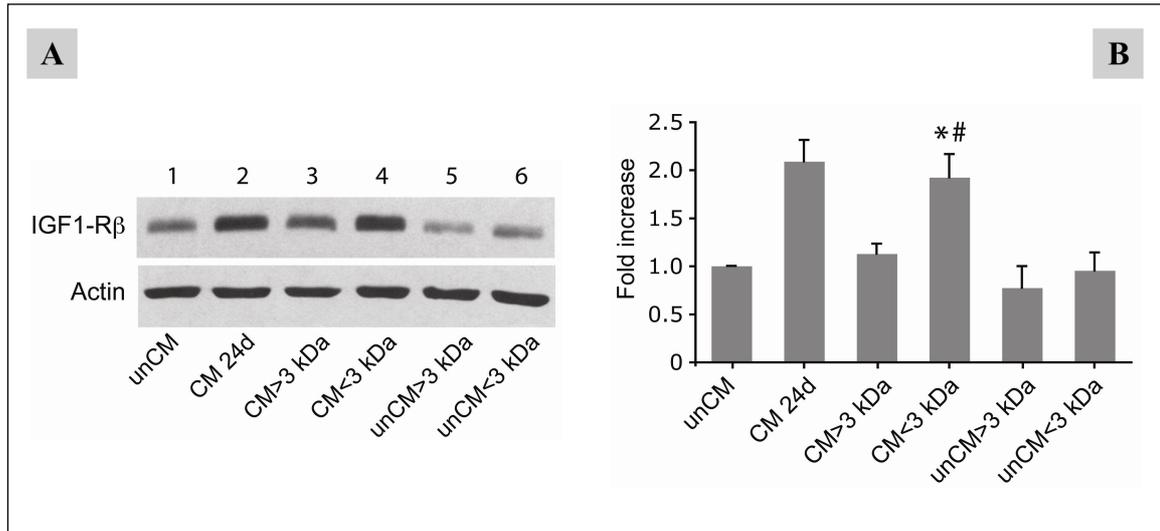


Fig. 30 - **A**: Analisi in Western Blot dell'espressione di IGF1-R in colture di neuroni corticali primari puri di ratto (trattate con Ara-C) e successivamente trattate per 3 giorni con terreno di crescita fresco non condizionato (unCM, lane 1); con terreno di crescita condizionato di colture neuronali di 24 giorni (CM 24d, lane 2); con il trattenuto di un terreno di crescita condizionato di una coltura mista di 24 giorni filtrato attraverso un concentratore Amicon Ultra-3 (CM >3kDa lane 3); con un terreno di crescita condizionato di una coltura mista di 24 giorni filtrato attraverso un concentratore Amicon Ultra-3 (CM <3kDa, lane 4); con il trattenuto (unCM >3kDa, lane 5) e il filtrato (unCM <3kDa, lane 6) di un terreno fresco non condizionato. **B**: Analisi densitometrica dell'intensità delle bande di IGF1-R relativa all'actina e normalizzata a quella di IGF1-R di neuroni trattati con unCM. I dati sono medie \pm SEM (n=5). * p <0.05 vs. unCM <3kDa, CM >3kDa. # p <0.01 (n=5) vs. unCM >3kDa. (ANOVA seguita dal test post hoc di Bonferroni).

Infine abbiamo cercato di caratterizzare la natura dei fattori solubili responsabili della up-regolazione dell'IGF1-R.

A questo scopo abbiamo trattato la frazione del CM filtrata (CM <3000 Da) con due diverse proteasi:

- *tripsina*
- *subtilisina*.

Dopo rimozione delle proteasi, ciascuna frazione in esame è stata aggiunta ad una coltura neuronale pura di 3 giorni.

Dal momento che non abbiamo rilevato alcuna variazione nei livelli del recettore rispetto alle frazioni intatte (Fig. 31, lane 2), abbiamo potuto concludere che i fattori responsabili della modulazione dell'espressione di IGF1-R potessero essere

o piccoli peptidi la cui sequenza non è riconosciuta dagli enzimi proteolitici oppure molecole di natura non proteica.

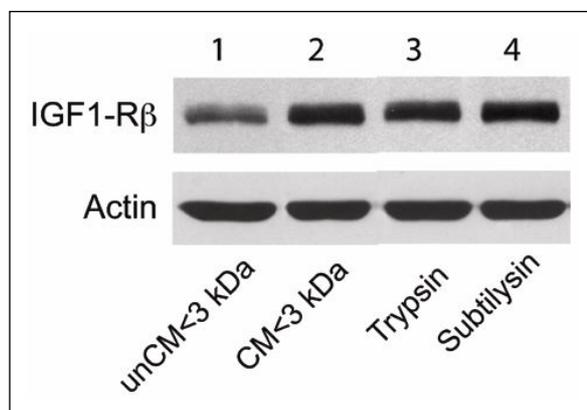


Fig. 31 - Analisi in Western Blot dell'espressione di IGF1-R in colture di neuroni corticali primari puri di ratto (trattate con Ara-C) dopo trattamento per 3 giorni con un terreno di crescita fresco non condizionato filtrato attraverso un concentratore Amicon Ultra-3 (unCM<3kDa, lane 1); con un terreno di crescita condizionato di una coltura mista di 24 giorni filtrato attraverso un concentratore Amicon Ultra-3 (CM<3kDa, lane 2); con il filtrato del CM trattato con tripsina (lane 3) o con subtilisina (lane 4). I risultati sono rappresentativi di due esperimenti.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti, forniscono nuove indicazioni sul ruolo fisiologico degli astrociti nella regolazione delle funzioni neuronali. Infatti cercando di determinare quali fossero i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione dell'espressione di IGF1-R nei neuroni durante la senescenza *in vitro*, abbiamo scoperto l'esistenza di un *cross-talk* tra neuroni e astrociti.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che:

- **Primo:** *la up-regolazione di IGF1-R nelle colture neuronali corticali primarie di ratto, dipende dalla presenza degli astrociti.*

Questo è stato evidenziato dal fatto che i livelli di IGF1-R sono fortemente ridotti e non aumentano durante la senescenza *in vitro* dopo trattamento delle colture con Ara-C, un inibitore della proliferazione gliale.

Le caratteristiche morfologiche dei neuroni trattati con Ara-C (*Fig. 20*), escludono che gli effetti osservati possono essere dovuti alla tossicità dello stesso Ara-C o alla mancanza degli astrociti per la sopravvivenza neuronale.

- **Secondo:** *analizzando la localizzazione di IGF1-R nelle colture neuronali abbiamo trovato che il ruolo principale degli astrociti è di up-regolare l'espressione del recettore nelle cellule neuronali.*

Infatti il livello di espressione di IGF1-R, analizzato mediante immunofluorescenza, era basso nei neuroni di 3 giorni, ma aumentava notevolmente nei neuroni

invecchiati di 24 giorni; l'espressione del recettore negli astrociti era invece debole o quasi assente a tutti i tempi esaminati (*Fig. 22*).

Dati recenti in letteratura (38,27) hanno tuttavia mostrato che altri tipi di cellule non neuronali, presenti nel cervello, come la microglia (39), gli oligodendrociti (40) e gli astrociti (41,27,42), possono esprimere IGF1-R.

Visti i dati da noi ottenuti, contrastanti con quelli presenti in letteratura, abbiamo analizzato l'espressione di IGF1-R in colture di astrociti puri.

Queste analisi indicano che IGF1-R è espresso negli astrociti puri coltivati da soli, ma il suo peso molecolare è superiore a quello osservato sia nei neuroni puri che nelle colture miste (*Fig. 24*). Nel nostro modello sperimentale quindi gli astrociti presenti nelle colture miste non esprimono IGF1-R, il contatto con i neuroni potrebbe inibire l'espressione del recettore negli astrociti.

➤ **Terzo:** *gli astrociti agiscono mediate il rilascio di fattori solubili.*

Questo risultato, è stato ottenuto con tre differenti approcci sperimentali:

1. l'aggiunta del terreno condizionato di una coltura neuronale "invecchiata" (dove la % degli astrociti è alta) ad una coltura neuronale "giovane" (in cui sia l'espressione di IGF1-R che la % degli astrociti è bassa) o ad una coltura di neuroni puri, provoca un aumento dell'espressione di IGF1-R (*Fig. 28*);
2. in neuroni primari trattati con Ara-C, IGF1-R aumenta dopo co-coltura con astrociti primari tenuti fisicamente separati dai neuroni mediante *trans-well* che consentono il solo passaggio di fattori solubili (*Fig. 26*);
3. il trattamento di neuroni puri con il terreno di coltura di astrociti primari è in grado di aumentare l'espressione del recettore (*Fig. 29*).

In *Fig. 32* è mostrata la morfologia degli astrociti puri posti sui *trans-well* prima e dopo co-coltura con i neuroni per 15 giorni. Gli astrociti sono stati colorati con

l'anticorpo che riconosce il marcatore specifico (GFAP). In accordo con osservazioni precedenti (43) si è visto che anche i neuroni rilasciano dei fattori solubili che inducono un differenziamento negli astrociti (*cross-talk*).

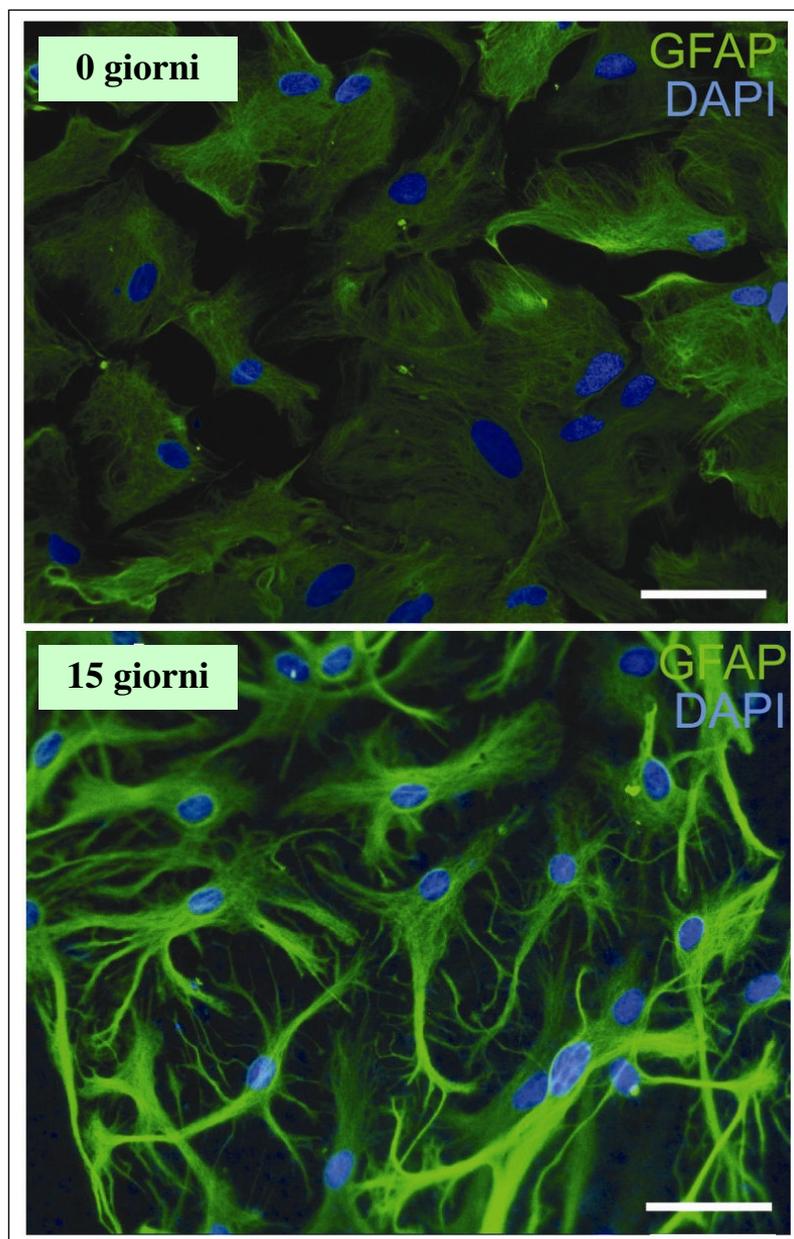


Fig. 32 - Immagini di immunofluorescenza, acquisite al microscopio a fluorescenza, di astrociti corticali puri di ratto seminati su trans-well dopo 0 (**pannello superiore**) e 15 (**pannello inferiore**) giorni di co-coltura con neuroni corticali primari puri di ratto trattati con Ara-C. Le cellule sono state evidenziate con anticorpo anti GFAP (verde) per gli astrociti ed i nuclei sono stati evidenziati con DAPI (blu). Scale bars 50 μ m.

- **Quarto:** i risultati mostrano che i fattori solubili prodotti dagli astrociti, responsabili della up-regolazione di IGF1-R, hanno un basso peso molecolare.

Infatti i componenti attivi del CM di 24 giorni di colture miste, in seguito a filtrazione attraverso un concentratore Amicon Ultra-3, si trovano nella frazione contenente molecole con un peso molecolare, inferiore ai 3000 Da.

Rimangono ora da identificare i fattori solubili rilasciati dagli astrociti, in grado di modulare l'espressione di IGF1-R nei neuroni.

Durante la senescenza delle colture neuronali abbiamo visto che gli astrociti acquisivano un fenotipo simile a quello di un *astrocita reattivo* (Fig. 19) (44).

Un astrocita diventa reattivo in seguito a stimolazione con differenti tipi di insulti, e questa è una caratteristica di molte neuropatologie, inclusa la malattia di Alzheimer (45).

Gli astrociti reattivi sono anche una caratteristica dell'invecchiamento (46,47), probabilmente come conseguenza dello stato infiammatorio e ossidativo del cervello invecchiato (48,49). Nell'astrocita reattivo il livello d'espressione di GFAP aumenta e si osserva ipertrofia.

Oltre a sostenere la validità del nostro modello sperimentale, per lo studio dell'invecchiamento del cervello, la presenza di astrociti reattivi può essere responsabile dell'aumentata espressione di IGF1-R nei neuroni, in quanto, dopo attivazione essi sono in grado di rilasciare una grande varietà di fattori, compresi fattori di crescita e citochine che potenzialmente possono avere un effetto sui neuroni (50).

Fino a qualche tempo fa si riteneva che gli astrociti avessero semplicemente un ruolo accessorio, di sostegno o nutrizione per i neuroni. Recenti studi indicano invece che queste cellule svolgono un ruolo primario nella formazione e nella plasticità dei circuiti neurali e che un deficit funzionale di queste cellule può contribuire a varie malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer, oltre ad avere un ruolo rilevante nell'invecchiamento del cervello (46,37,51).

In conclusione i nostri dati sostengono l'esistenza di una comunicazione bidirezionale tra astrociti e neuroni che emerge come un importante paradigma,

non solo in condizioni fisiologiche ma anche nello sviluppo di patologie (37), comprese le malattie neurodegenerative (37,52,53) come la malattia di Alzheimer. Visto le implicazioni del signaling di IGF1-R nella modulazione della produzione di A β nei neuroni (38), l'identificazione dei fattori solubili rilasciati dagli astrociti, può offrire concrete opportunità per interventi farmacologici o biologici, volti al fine di modificare l'espressione di questo recettore, la conseguente cascata di signaling e ritardare l'insorgenza della malattia di Alzheimer.

CONCLUSIONI

I risultati presentati in questa tesi possono essere così riassunti:

- il livello di espressione di IGF1-R aumenta nei neuroni primari di ratto durante la senescenza *in vitro* confermando risultati precedenti ottenuti *in vivo* in neuroni primari di topo;
- gli astrociti presenti nella coltura sono necessari per l'up-regolazione di IGF1-R nei neuroni durante la senescenza *in vitro*;
- il *cross-talk* tra astrociti e neuroni è indipendente dal contatto fisico, ma è mediato da fattori solubili;
- i fattori solubili rilasciati dagli astrociti hanno un peso molecolare inferiore a 3000 Da. Potrebbero essere piccoli peptidi o molecole di natura non proteica.

Alla luce di questi risultati, l'obiettivo è ora l'identificazione dei fattori solubili rilasciati dagli astrociti responsabili della modulazione del recettore, utile per la comprensione dei meccanismi molecolari di regolazione di IGF1-R. Infatti, una volta identificati, tali fattori solubili potranno consentire di studiare l'espressione di IGF1-R in cellule neuronali corticali pure e l'implicazione di possibili recettori di superficie a cui i fattori stessi si legano. Ciò in prospettiva potrebbe rappresentare un primo passo nell'identificazione di bersagli farmacologici al fine di ritardare l'insorgenza della malattia di Alzheimer. Inoltre, i risultati sostengono un ruolo rilevante degli astrociti nel processo di invecchiamento e nei processi patologici associati all'invecchiamento come la malattia di Alzheimer.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Holtzman DM. 2001. *Role of apoE/A β interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy.* J Mol Neurosci. 17:147-155.
- (2) Selkoe DJ. 2001. *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.* Physiol Rev. 81:741-766.
- (3) Muresan Z, and Muresan V. 2005. *c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-3 facilitates phosphorylation and controls localization of amyloid-beta precursor protein.* J Neurosci. 25:3741-3751.
- (4) Hardy J, and Selkoe DJ. 2002. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* Science. 297:353-356.
- (5) Zlokovic BV. 2004. *Clearing amyloid through the blood-brain barrier.* J Neurochem. 89:807-811.
- (6) Guenette SJ. 2003. *Mechanisms of Abeta clearance and catabolism.* Neuromolecular Med. 4:147-160.
- (7) Tanzi RE, Moir RD, and Wagner SL. 2004. *Clearance of Alzheimer's A β peptide : the many roads to perdition.* Neuron. 43:605-608.

- (8) Glabe C. 2001. *Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci. 17:137-145.
- (9) Klein WL, Stine WB, and Teplow DB. 2004. *Small assemblies of unmodified amyloid β -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. 25:569-580.
- (10) Lorenzo A, and Yankner BA. 1994. *β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red*. Proc Natl Acad Sci U S A. 91:12243-12247.
- (11) Koh JY, Yang LL, and Cotman CW. 1990. *β -amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage*. Brain Res. 533:315-320.
- (12) Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvo L Jr, Baron P, Villalba M, Ferari D, and Rossi F. 1995. *Activation of microglia cells by β -amyloid protein and interferon- γ* . Nature. 374:647-650.
- (13) Della Bianca V, Dusi S, Bianchini E, Dal Pra I, and Rossi F. 1999. *β -amyloid activates O_2 -forming NADPH oxidase in microglia, monocytes and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease*. J Biol Chem. 274: 15493-15499.
- (14) Querfurth HW, MD, PhD, and La Ferla MD, PhD. 2010. *Alzheimer's disease*. N Engl J Med. 362:329-344.
- (15) Gong Y, Chang L, Viola KL, Lambert MP, Frinch CE, Krafft GA, and Klein WL. 2003. *Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric $A\beta$ ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100:10417-10422.

- (16) Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Kulln WK, Anwyl R, wolfe MS, Rowan MJ, and Selkoe DJ. 2002. *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. Nature. 416:535-539.
- (17) Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, and Trommer BL. 2002. *Soluble oligomers of β -amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus*. Brain Res. 924:133-140.
- (18) Werner H, and Maor S. 2006. *The insulin-like growth factor.1 receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action*. Trends Endocrinol Metab. 17:236-242.
- (19) Bondy CA, and Cheng CM. 2004. *Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain*. Eur J Pharmacol. 490:25-31.
- (20) Carro E, and Torres-Aleman I. 2004. *The role of insulin and insulin like growth factor 1 in the molecular and cellular mechanism underlying the pathology of Alzheimer's disease*. Eur J Pharmacol. 490:127-133.
- (21) Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, and Werther GA. 2005. *The insulin-like growth factor system and its pleiotropic function in brain*. Endocrine Reviews. 26(7):916-943.
- (22) Carro L, Trejo JL, Gomez-Isla T, Le Roith D, and Torres-Aleman I. 2002. *Serum insulin-like growth factor 1 regulates brain amyloid- β levels*. Nature Med. 8(12):1390-1397.
- (23) Gualco E, Wang JY, Del Valle L, Urbanska K, Peruzzi F, Khalili K, Amini S, and Reiss K. 2009. *IGF-1R in neuroprotection and brain tumors*. Biosci. 14:352-375.

- (24) Federici M, Porzio O, Zucaro L, Fusco A, Borboni P, Lauro D, and Sesti G. 1997. *Distributio of insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors in human tissues*. Mol Cell Endocrinol. 129:121-126.
- (25) Puglielli L. 2008. *Aging of the brain, neurotrophin signaling, and Alzheimer's disease: is IGF1-R the common culprit?* Neurobiol Aging. 29:795-811.
- (26) Lesort M, and Johnson GV. 2000. *Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons*. Neuroscience. 99:305-316.
- (27) Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, and O'Neill C. 2008. *Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signaling*. Neurobiol Aging. 31:224-243.
- (28) Freude S, Schilbach K, and Schubert M. 2009. *The role of IGF-1 receptor and insulin receptor signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: from model organism to human disease*. Current Alzheimer Research. 1565:2050-2059.
- (29) Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, and Dilling A. 2009. *Reduced IGF-1 Signaling Delays Age-Associated Proteotoxicity in Mice*. Cell. 139:1157-1169.
- (30) Longo VD, and Finch CE. 2003. *Evolutionary medicine: from Dwarf model systems to healthy centenarians?* Science. 299:1342-1346.
- (31) Kenyon C. 2005. *The plasticity of aging: insights from long-lived mutants*. Cell. 120:449-460.
- (32) Broughton S, and Partridge L. 2009. *Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging*. Biochem J. 418:1-12.

- (33) Costantini C, Scrabble H, and Puglielli L. 2006. *An aging pathway controls the TrkA to p75^{NTR} receptor switch and amyloid beta-peptide generation.* EMBO J. 5:1997-2006.
- (34) Costantini C, Weindruch R, Della Valle G, and Puglielli L. 2005. *A TrkA-to-p75^{NTR} molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging.* Biochem J. 391:59-67.
- (35) Saura J, Tusell JM, and Serratososa J. 2003. *High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization.* Glia. 44:183-189.
- (36) Burgess SK, Jacobs S, Cuatrecasas P, and Sahyoun N. 1987. *Characterization of a neuronal subtype of insulin-like growth factor 1 receptor.* J Biol Chem. 262:1618-1622.
- (37) Araque A. 2006. *Astrocyte-neuron signaling in the brain implication for disease.* Curr Opin Investig Drugs. 7:619-624.
- (38) Bondy CA, and Cheng CM. 2004. *Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain.* Eur J Pharmacol. 490:25-31.
- (39) Chesik D, De Keyser J, and Wilczak N. 2004. *Involvement of insulin-like growth factor binding protein-2 in activated microglia as assessed in post mortem human brain.* Neurosci Lett. 362:14-16.
- (40) Zeger M, Popken G, Zhang J, Xuan S, Lu QR, Schwab MH, Nave KA, Rowitch D, D'Eercole AJ, and Ye P. 2007. *Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination.* Glia. 55:400-411.
- (41) Mendez P, Wandosell F, and Garcia-Segura LM. 2006. *Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-1 receptor in the brain: cellular and molecular mechanism.* Front Neuroendocrinol. 27:391-403.

- (42) Quesada A, and Romeo HE, Micevych P. 2007. *Distribution of localization patterns of estrogens receptor-beta and insulin-like growth factor-1 receptors in neurons and glial cells of the female rat substantia nigra: localization of ErbB2 and IGF1-R in substantia nigra*. J Comp Neurol. 503:198-208.
- (43) Gomes FC, Spohr TC, Martinez R, and Moura Neto V. 2001. *Cross-talk between neuron and glia: highlights on soluble factors*. Braz J Med Biol Res. 34:611-620.
- (44) Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, and Pekny M. 2006. *Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury*. Proc Natl Acad Sci U S A. 103:17513-17518.
- (45) Blasco I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, and Grubeck-Loebenstein B. 2004. *How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer disease in old age: the role of microglia and astrocytes*. Aging Cell. 3:169-176.
- (46) Cotrina ML, and Nedergaard M. 2002. *Astrocytes in the aging brain*. J Neurosci Res. 67:1-10.
- (47) Hayakawa N, Kato H, and Araki T. 2007. *Age-related changes of astrocytes, oligodendrocytes and microglia in the mouse hippocampal CA1 sector*. Mech Ageing Dev. 128:311-316.
- (48) Godbout JP, and Johnson RW. 2006. *Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences*. Neurol Clin. 24:521-538.
- (49) Yankner BA, Lu T, and Loerch P. 2008. *The aging brain*. Annu Rev Pathol. 3:41-66.
- (50) Farina C, Aloisi F, and Meinl E. 2007. *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity*. Trends Immunol. 28:138-145.

- (51) Steven B. 2008. *Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. Neurosignals.* 16:278-88.
- (52) Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, and Eggan K. 2007. *Non-cell autonomous effect of gliosis on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. Nat Neurosci.* 10:608-614.
- (53) Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessel TM, Wichterle H, and Przedborski S. 2007. *Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. Nat Neurosci.* 10:615-622.

Ringraziamenti

Per ringraziare tutte le persone che in questa avventura mi sono state accanto ci vorrebbero pagine e pagine...

Il primo “grazie” speciale va solo ai miei genitori, che in tutti questi anni mi hanno sostenuta e appoggiata in ogni mia scelta, incoraggiandomi nei momenti di sconforto e gioendo con me nei momenti di felicità. Senza di loro non sarei mai arrivata fino a questo giorno e non sarei riuscita a realizzare il mio sogno. Grazie mamma, grazie papà per essere le persone che siete!!! per l'esempio che mi avete dato e per avermi fatta diventare la donna che oggi sono, che solo per voi oggi diventerà "Dottoressa"... a voi dedico questo titolo.

Un altro “grazie” speciale va d Emanuele, mio compagno nella vita, unico in grado di stimolarmi e spronarmi ogni giorno a chiedere sempre di più a me stessa. Grazie per i tuoi silenzi nei miei chiassosi momenti di crisi. Grazie per tutti i chilometri che hai fatto solo per tenermi la mano e dirmi che l'esame ed ogni cosa sarebbe andata bene... "Io non tremo...".

Grazie al nonno Italo che mi ha tenuta per mano dal primo giorno in cui sono arrivata a Padova per l'iscrizione, e che non mi ha mai abbandonata sia durante lo studio sia durante lo svolgersi di ogni esame! Certa che sarai con me anche nel momento in cui discuterò questa tesi, è a te, che come piccolo segno di riconoscenza, voglio dedicare il mio primo e forse unico grande lavoro!

Grazie alla nonna Anna e alle sue “mance” che arrivavano puntuali dopo ogni esame. Grazie per essere la persona speciale quale sei, la nonna che ogni nipote vorrebbe sempre presente in tutti i momenti importanti della vita... come avrei fatto senza il "mio pacco"...

Grazie al nonno Armando che con la sua ironia sdrammatizzava i momenti difficili, concludendo con: "Ascolta... cavame 'na curiosità... ma quanti esami te manca ancora?!..." Grazie per il computer che mi hai regalato, senza il quale non avrei scritto questa tesi.

Grazie ai miei cari zii. Grazie Gianni e Stefania per il senso di protezione che mi avete sempre trasmesso. Grazie Giancarlo e Mara per la confidenza, la complicità e il sostegno costante che mi avete regalato. Grazie Marco per l'amicizia e le "coccole" che mi hai sempre dato nel momento del bisogno.

Grazie ad Osvaldo e Susanna per la stima e la considerazione che avete nei miei confronti. Grazie perché avete sempre creduto in me.

Grazie alla Prof.ssa Irato che mi ha accompagnata durante questo lungo e difficile percorso. Grazie per i preziosi consigli che mi ha elargito nei momenti critici allontanando le mie indecisioni. Grazie per la disponibilità e la costante discreta ed indispensabile presenza.

Grazie di cuore alla Prof.ssa Della Bianca, per avermi dato la possibilità di realizzare questa tesi e, per la costante disponibilità dimostratami in questo anno, per avermi insegnato a lavorare in laboratorio e per avermi seguita con pazienza e dedizione.

Grazie di cuore a tutti voi che non vi ho nominato personalmente, ma che mi siete stati vicino sempre con caloroso affetto.

Grazie a tutti, davvero.

