

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Biomarcatori della reattività astrocitaria nelle patologie neurodegenerative.**

**Tutor: Dott.ssa Laura Civiero**

**Dipartimento di biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Elena Giusto**

**San Camillo IRCCS, Venezia**

**Laureanda: Camilla Valmassoi**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**

## INDICE

<b>Abstract</b> .....	3
<b>Capitolo 1: Introduzione</b> .....	4
<b>1.1: Reattività astrocitaria: la risposta degli astrociti a patologie e stimoli lesivi.</b> .....	4
<b>1.2: Cosa si intende per biomarcatore?</b> .....	5
<b>1.3: Difficoltà nell'utilizzo degli attuali biomarcatori</b> .....	6
<b>Capitolo 2: Biomarcatori astrocitari presenti nei fluidi</b> .....	6
<b>2.1: Proteina fibrillare acida della Glia: GFAP</b> .....	6
<b>2.2: S100B</b> .....	9
<b>2.3: YKL-40</b> .....	11
<b>Capitolo 3: Biomarcatori veicolati da esosomi</b> .....	12
<b>3.1: Vescicole extracellulari: gli esosomi</b> .....	13
<b>3.2: MicroRNA esosomiali rilasciati da astrociti reattivi</b> .....	13
<b>Capitolo 4: Biomarcatori rilevabili tramite imaging</b> .....	15
<b>4.1: Tecniche di imaging: ibridi PET/MR</b> .....	15
<b>4.2: Radiotracciante PET legante la Monoamino ossidasi B</b> .....	16
<b>Capitolo 5: Conclusione</b> .....	18

## **Abstract**

Gli astrociti sono cellule gliali del sistema nervoso centrale (SNC), che svolgono diverse funzioni relative al mantenimento dell'omeostasi cerebrale.

Questa tesi prende in esame principalmente la reattività astrocitaria, una condizione in cui gli astrociti subiscono cambiamenti morfologici e funzionali a seguito di lesioni al SNC o patologie neurodegenerative. In questo elaborato, sono riportati studi recenti che hanno permesso di individuare alcune molecole, prodotte dagli astrociti reattivi, che potrebbero risultare utili come biomarcatori per la diagnosi ed il monitoraggio di patologie neurodegenerative.

I primi biomarcatori proposti sono le proteine: GFAP (dall'inglese Glial Fibrillary Acidic Protein), S100B (S100 calcium-Binding protein B) e YKL-40, denominata anche CHI3-L1 (Chitinase-3-like protein 1). Negli studi riportati in questo elaborato, tali marcatori sono stati misurati nel sangue e/o nel liquido cerebrospinale (LCS), di pazienti con patologie neurologiche mettendoli a confronto con individui sani.

Una seconda classe di biomarcatori proposta include un insieme di molecole, note come microRNA, prodotte dagli astrociti reattivi e successivamente veicolate negli esosomi.

Infine viene presa in considerazione la monoamino ossidasi B (MAO-B), un enzima espresso dagli astrociti reattivi la cui presenza è rilevabile attraverso radiotraccianti PET (dall'inglese positron emission tomography). Sono inoltre stati discussi i vantaggi e gli svantaggi dei marcatori proposti sottolineando le problematiche che la ricerca in questo campo sta affrontando e dipanando con approcci moderni.

## Capitolo 1: introduzione

### 1.1: Reattività astrocitaria: la risposta degli astrociti a patologie e stimoli lesivi.

Le cellule della glia, chiamate anche cellule gliali o neuroglia, sono una popolazione eterogenea che può essere suddivisa in macroglia e microglia. La prima comprende oligodendrociti, astrociti, cellule ependimali e glia periferica; la microglia, invece, è composta da cellule dedite alla difesa del sistema nervoso. Complessivamente, queste cellule insieme a vasi ed ai neuroni formano il sistema nervoso centrale (SNC). Gli astrociti, così denominati per la loro particolare morfologia stellata (dal latino *astrum*, stella), sono le cellule gliali più numerose del SNC e, in condizioni fisiologiche, svolgono numerose funzioni. Assieme a periciti ed alle cellule endoteliali infatti, gli astrociti si occupano della formazione e del mantenimento della barriera ematoencefalica, mantengono l'omeostasi cerebrale, fungono da supporto alla formazione ed alla funzionalità del SNC, ed intervengono nella rimozione di detriti cellulari e di sinapsi soprannumerarie. Inoltre, gli astrociti interagiscono con i neuroni e partecipano alla funzionalità sinaptica ed alla rimozione del glutammato extracellulare. Un'ulteriore ed interessante funzione degli astrociti, seppur attualmente non completamente compresa, è la loro capacità di regolare la risposta infiammatoria nel SNC. Gli astrociti infatti, in caso di danno o patologia, si possono attivare e rilasciare fattori pro-infiammatori o acquisire attività fagocitica [1]. Gli astrociti hanno inoltre la capacità di adattarsi alle richieste del SNC e questa loro abilità suggerisce che essi possano essere fra le prime cellule a rispondere in condizioni di danno al SNC [1].

In condizioni patologiche, gli astrociti subiscono una serie di modifiche a livello morfologico e metabolico che vengono collettivamente identificate con il termine reattività astrocitaria [2].

Queste variazioni si traducono nell'acquisizione di nuove funzioni aberranti e nella perdita o deregolazione delle funzioni fisiologiche [2]. In particolare, l'ipertrofia astrocitaria, condizione per cui si ha un aumento anomalo delle dimensioni degli astrociti ed un rilascio non fisiologico di molecole dagli stessi, rappresenta una delle principali caratteristiche della reattività astrocitaria (nota anche come gliosi) [2].

Poiché l'attività degli astrociti è fortemente legata alle funzionalità del SNC, ed alle patologie che lo colpiscono, si presuppone che alcune delle molecole, prodotte dagli astrociti attivati possano fungere da biomarcatori ed aiutare nella diagnosi e nel trattamento di patologie a carico del SNC.

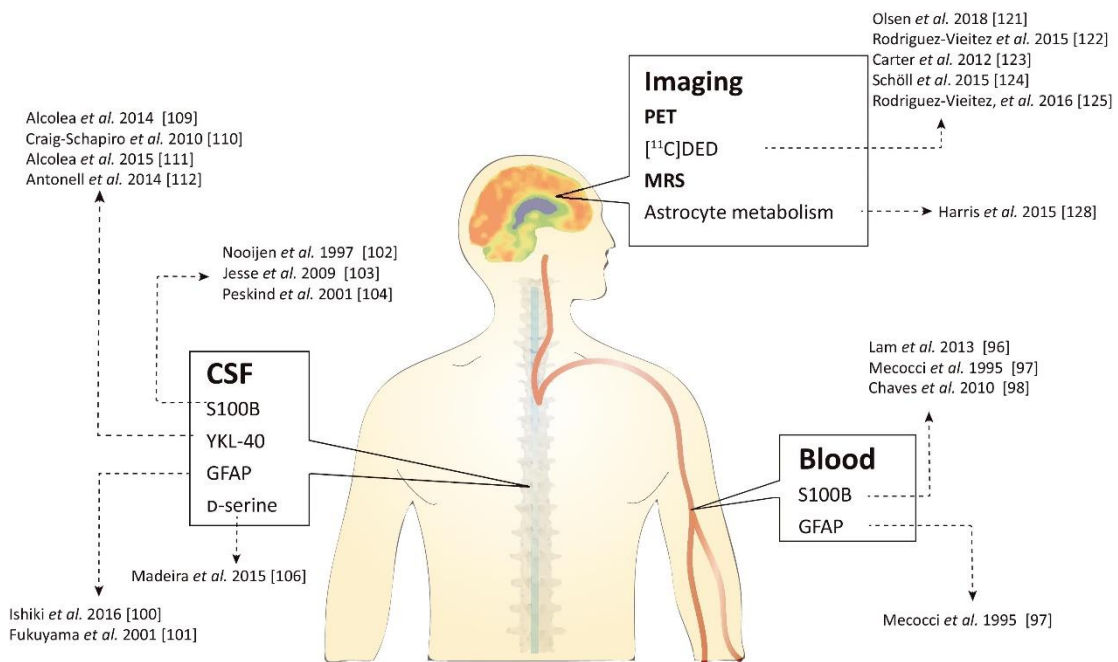
## 1.2: Cosa si intende per biomarcatore?

I biomarcatori sono un insieme di molecole biologiche che possono essere rilevate e misurate nei tessuti, nelle cellule e nei biofluidi (come ad esempio sangue e LCS). Una variazione nella loro espressione può essere indice dell'insorgenza di una patologia, ed offrire anche una panoramica sulla prognosi, la progressione e l'efficacia di un processo terapeutico [3].

Ad oggi non sono presenti biomarcatori specifici, di origine astrocitaria, che possano essere utilizzati come indicatore di patologia neurodegenerativa. Studi recenti stanno però investigando la possibilità di utilizzare molecole prodotte da astrociti reattivi come biomarcatori di patologie del SNC [4].

Gli astrociti reattivi producono diverse classi di molecole che vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare e che potrebbero essere utilizzate come biomarcatori. In **Figura 1** vengono riportate le principali molecole, prodotte da astrociti reattivi in un paziente affetto dal morbo di Alzheimer (AD dall'inglese Alzheimer disease), che sono state studiate come possibili biomarcatori [1].

In questo elaborato, verranno evidenziati i biomarcatori presenti nel sangue e nel LCS, dei pazienti che hanno partecipato agli studi che verranno riportati, alcuni veicolati da vescicole esosomiali ed infine i biomarcatori per i quali sono stati sintetizzati radiotraccianti per la tomografia a emissione di positroni (PET).



Trends in Molecular Medicine

**Figura 1:** Principali molecole, prodotte da astrociti reattivi, rilevate nei biofluidi e tramite tecniche di imaging in un paziente affetto da AD.

Tratto da Carter et al, 2019.

### **1.3: Difficoltà nell'utilizzo degli attuali biomarcatori**

Idealmente un biomarcatore deve essere facilmente misurabile e specifico per una determinata patologia [3]. Per essere misurato con facilità un biomarcatore dev'essere innanzitutto accessibile ad una specifica tecnica diagnostica e presente in concentrazioni tali che possano essere rilevate dagli strumenti. I marcatori che si prestano meglio a ciò sono quelli circolanti, che si possono trovare nei fluidi come sangue e plasma, e quindi reperibili con un semplice prelievo sanguigno, o nel LCS, prelevabile tramite puntura lombare.

Nonostante il LCS rifletta al meglio ciò che avviene nel SNC, il prelievo, ottenuto tramite puntura lombare, risulta essere una tecnica molto invasiva e dolorosa per il paziente, rappresentando un ostacolo per la ricerca.

Un altro problema è rappresentato dalla specificità. Infatti molti meccanismi alla base della neurodegenerazione, come infiammazione e conseguente attivazione astrocitaria, condizioni di stress o accumulo di proteine mal ripiegate, sono spesso comuni a diverse malattie neurodegenerative. Risulta difficile dunque identificare una o più molecole che possano essere associate in modo esclusivo per una specifica condizione patologica [4]. Per questo motivo ad oggi non esistono ancora biomarcatori in grado di distinguere in modo specifico malattie come AD o la sclerosi multipla (MS dall'inglese Multiple Sclerosis). È necessario quindi trovare biomarcatori specifici, per comprendere la relazione tra determinati processi biologici e risultati clinici, e soprattutto che siano facili da ottenere [4]. La ricerca scientifica nel campo delle patologie neurodegenerative, e l'evoluzione continua delle conoscenze che sta portando a riguardo, rappresenta la possibilità più concreta che si possiede di riuscire ad identificare dei biomarcatori per tali malattie.

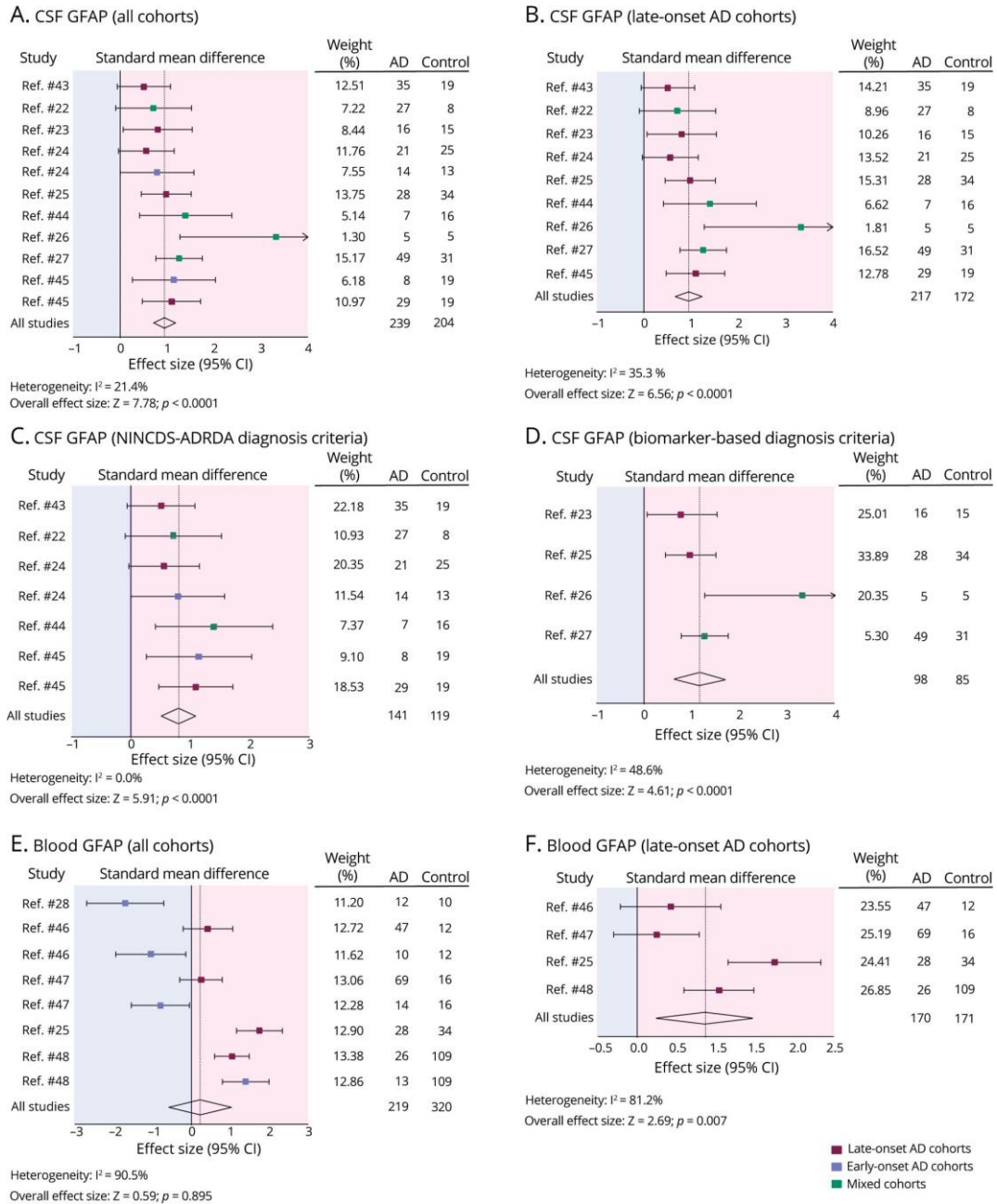
## **Capitolo 2: Biomarcatori astrocitari presenti nei fluidi**

### **2.1: Proteina fibrillare acida della Glia: GFAP**

Il gene GFAP, dall'inglese Glial Fibrillary Acidic Protein, è stato mappato sul cromosoma 17q21.1-q25 (circa 10 kb di DNA), ed è costituito da 8 introni e 9 esoni, con 4 esoni alternativi e 2 introni alternativi (3 kb, mRNA) [5]. GFAP è una proteina del citoscheletro acida relativamente non solubile [5]. Questa proteina viene espressa principalmente dagli astrociti, e può fungere come marcatore per tali cellule.

Tuttavia la presenza di GFAP, seppur in quantità trascurabile per gli studi sui marcatori neurologici, è stata riscontrata anche nell'epitelio del cristallino, nelle cellule di Schwann non mielinizzanti, nelle cellule di Leydig,

nelle cellule stellate del fegato e nel pancreas, nella glia enterica, nei podociti, nelle cellule mesangiali e nei condrociti [5]. GFAP appartiene alla classe dei filamenti intermedi di tipo III, i quali sono responsabili della regolazione di diversi processi cellulari, tra i quali: la migrazione e la divisione cellulare. L'interesse per questa proteina, nel suo utilizzo come biomarcatore, risiede però nella sua sovraespressione, da parte degli astrociti, a seguito di lesioni e traumi al SNC o malattie neurodegenerative [5]. Nello studio condotto da Bellaver e colleghi sono stati misurati i livelli di GFAP nei biofluidi mettendo a confronto i valori rilevati in pazienti affetti da AD e quelli di individui sani [4]. Nello specifico, GFAP è stato misurato nel LCS e nel sangue di 205 pazienti sani, suddivisi in 10 coorti, e in 239 pazienti con AD, suddivisi in 11 coorti, suddivise a loro volta in base al metodo usato per diagnosticare la malattia e all'insorgenza precoce o tardiva della stessa, rispettivamente EOAD (dall'inglese Early-Onset Alzheimer disease) o LOAD (dall'inglese Late-Onset Alzheimer disease). La misurazione è stata effettuata tramite diverse metodologie, principalmente tramite ELISA (Dall'inglese Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) [4]. I risultati, riportati nella seguente tabella (**Figura 2**), dimostrano che i livelli di GFAP misurati nel LCS nei pazienti con AD sono più elevati rispetto a quelli riscontrati negli individui sani [4]. I dati sono stati ulteriormente analizzati distinguendo le diverse coorti ed i criteri diagnostici utilizzati per individuare la malattia nei diversi pazienti [4]. Gli autori hanno analizzato anche i livelli di GFAP nel sangue. Questa analisi, inizialmente, non ha evidenziato variazioni dei livelli della proteina tra soggetti sani e pazienti affetti da AD [4]. In seguito ad analisi più approfondite, eseguite eliminando le coorti di soggetti con EOAD, si è visto che i soggetti affetti da LOAD presentano livelli ematici di GFAP più alti rispetto ai soggetti sani [4].



**Figura 2:** Livelli di GFAP nel LCS e sangue in pazienti affetti da AD a confronto con soggetti sani. (A) Livelli di GFAP nel LCS relativo a tutte le coorti, (B) livelli di GFAP nel LCS di coorti affette da LOAD, (C-D) livelli di GFAP nel LCS di coorti divise in base al criterio di diagnosi (E) livelli di GFAP nel sangue relativo a tutte le coorti, (F) livelli di GFAP nel sangue di coorti affette da LOAD.

Tratto da Bellaver et al, 2021.

Per quanto però lo studio abbia evidenziato un'effettiva differenza fra i livelli della proteina nel LCS di soggetti malati e non, GFAP non può essere usata come biomarcatore peculiare per AD. La sovraespressione di GFAP da parte degli astrociti, infatti, è caratteristica aspecifica della reattività



astrocitaria. Come accennato, infatti, quest'ultima si verifica: in seguito all'insorgere di diverse patologie neurodegenerative o successivamente a traumi cranici [2]. Inoltre, è stato riscontrato che l'espressione di GFAP è modulata anche da stimoli fisiologici come l'attività fisica, l'esposizione ad ambienti arricchiti e ai glucocorticoidi oltre ad aumentare con l'invecchiamento [5]. Pertanto, i cambiamenti nell'espressione di GFAP possono anche riflettere la plasticità adattativa fisiologica piuttosto che evidenziare la risposta astrocitaria a stimoli patologici [2].

## 2.2: S100B

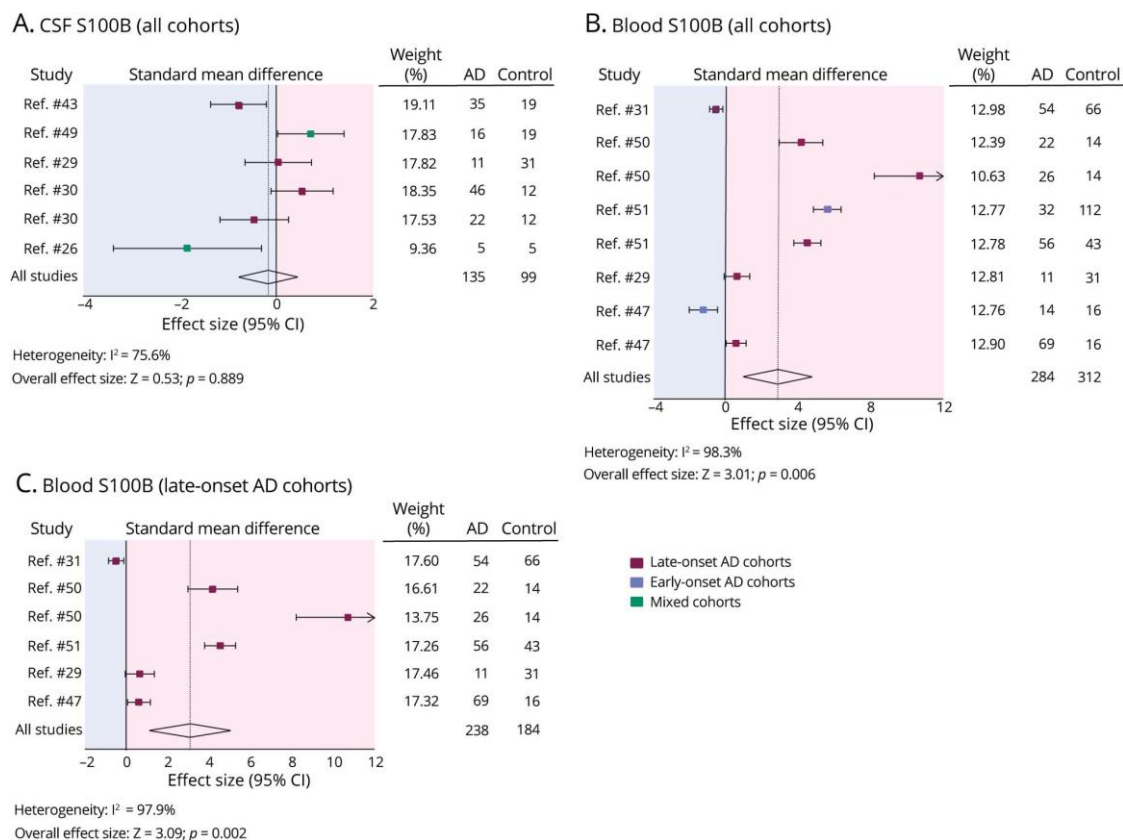
S100B è un omodimero acido, in cui ciascun monomero pesa 9-14kDa, e costituisce la maggior parte della frazione proteica originariamente isolata dagli estratti cerebrali. L'elevata conservazione della sua composizione aminoacidica e della sua conformazione proteica in vari organismi (principalmente nei vertebrati), suggerisce che questa proteina potrebbe avere un ruolo biologico cruciale per la funzionalità cellulare [6]. Appartiene infatti alla famiglia proteica S100, proteine leganti il calcio, e viene rilasciata dalle cellule danneggiate ma è anche prodotta dagli astrociti reattivi. Tuttavia la proteina S100B non è prodotta solo dagli astrociti ma viene sintetizzata da diverse altre tipologie di cellule, quali linfociti, adipociti e anche dai cardiomiociti a seguito di infarto [4]. A livello intracellulare S100B funge da sensore calcio dipendente, regolando diverse attività cellulari tra cui, soprattutto, proliferazione e differenziamento [6]. A livello extracellulare, è in grado di interagire con il recettore per i prodotti finali di glicazione avanzata (RAGE), un recettore che lega una vasta gamma di ligandi e che promuove una cascata di segnali intracellulari che può essere associata a diversi casi clinici di danno neuronale [6].

L'interesse per questa proteina crebbe quando, alla fine degli anni '70, furono rilevati livelli elevati di S100B nel LCS di pazienti affetti da MS [6]. Successivamente furono eseguite ulteriori misurazioni, dei livelli della proteina, in altri biofluidi come: sangue periferico, sangue cordonale, liquido amniotico e saliva, di pazienti affetti da diverse patologie (AD, PD e MS) evidenziando, anche in questo caso, valori più elevati rispetto ad una condizione fisiologica [6]. I risultati ottenuti portarono alla formulazione dell'ipotesi che il livello di S100B nei biofluidi potesse essere usato come biomarcatore di generica sofferenza neuronale [6].

Nello stesso studio riportato nel paragrafo riguardante GFAP, i ricercatori sono andati ad indagare anche il livello di S100B nei biofluidi, domandandosi se potesse essere usato come biomarcatore per AD.

Come riportato in **Figura 3** i livelli di S100B nel LCS dei pazienti diagnosticati con AD non presentano variazioni significative rispetto ai livelli

rilevati negli individui sani [4]. Al contrario, i livelli di S100B nel sangue risultano essere più elevati negli individui con AD rispetto alle coorti di controllo [4].



**Figura 3:** Livelli di S100B nel LCS e sangue in pazienti affetti da AD a confronto con soggetti sani. (A) Livelli di S100B nel LCS relativi a tutte le coorti, (B) livelli di S100B nel sangue relativi a tutte le coorti (C) livelli di S100B nel sangue di coorti di pazienti affetti da LOAD. Tratto da Bellaver et al, 2021.

Nonostante la differenza nei livelli ematici di S100B, anche questa proteina, così come GFAP, non può essere considerata come biomarcatore specifico per AD. Tuttavia i dati raccolti dagli anni '70 ad oggi hanno dimostrato che S100B risulta essere un ottimo biomarcatore della sofferenza neuronale e la rilevazione dei suoi livelli risulta essere comunque importante e di aiuto in campo diagnostico e nel monitoraggio del decorso della patologia (AD) [6]. Nonostante ciò, l'ampio spettro di patologie e condizioni, che portano ad un aumento dei livelli della proteina nei biofluidi, ne diminuiscono altamente la specificità [6].

### 2.3: YKL-40

YKL-40, denominata anche CHI3-L1 (Chitinase-3-like protein 1), è una proteina che appartiene alla famiglia delle glicosil idrolasi, enzimi idrolitici in grado di rompere il legame glicosidico presente nella chitina. Il gene umano codificante YKL-40 si trova in un'area altamente mantenuta sul cromosoma 1q31-q32 [7]. Questa proteina viene prodotta prevalentemente da astrociti in condizioni patologiche.

Una delle funzioni principali di YKL-40 è quella di regolare i livelli del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), la cui espressione viene incrementata generalmente in condizioni di ipossia. VEGF infatti promuove l'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi capillari, facendo quindi aumentare l'apporto di ossigeno all'organo o al tessuto che si trova in uno stato d'ipossia.

L'espressione di questo fattore aumenta anche in presenza di tumori, in quanto le cellule più interne della massa tumorale, man mano che essa cresce, vanno incontro ad uno stato d'ipossia.

I livelli sierici di YKL-40 di pazienti con malattie infiammatorie e neoplasie maligne sono infatti più alti rispetto ai soggetti sani. Studi in letteratura hanno però dimostrato anche una relazione tra YKL-40 e MS, dove YKL-40 è prodotto prevalentemente da astrociti reattivi nelle lesioni croniche attive della MS. Difatti i livelli di YKL-40 nel LCS di pazienti con MS risultano essere maggiori rispetto a quelli di individui sani [7]. Di seguito saranno riportati due studi che analizzano i livelli di YKL-40 nei biofluidi di individui affetti da AD e MS.

Nello primo studio sono stati analizzati campioni di sangue di 59 pazienti con MS (39 con sclerosi multipla remittente, RRMS e 20 con sindrome clinicamente isolata, CIS) e di 35 individui sani [7].

Come evidenziato dalla tabella riportata di seguito (**figura4**) i livelli di YKL-40 misurati, tramite ELISA nel siero dei pazienti diagnosticati con una delle due sindromi risultano essere molto più elevati rispetto agli individui sani [7].

		Control group (n = 35)	CIS patients (n = 20)	RRMS patients (n = 39)	p
Gender	Female	27	15	31	
	Male	8	5	8	
YKL-40 [pg/mL]	11.0** [10.0-17.3]	20.2** [9.8-75.9]	22.7** [13.4-57.9]	<0.001	

\*\*Data are expressed as median [Min-Max]. CIS: Clinically isolated syndrome; RRMS: Relapsing-remitting multiple sclerosis; MS: Multiple sclerosis.

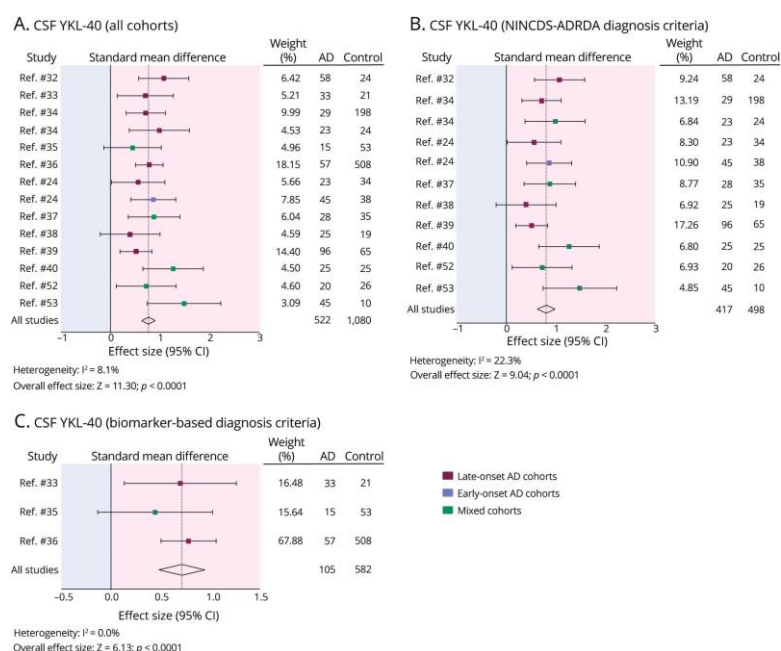
**Figura 4:** Livelli di YKL-40 nel siero in pazienti affetti da CIS e RRMS a confronto con soggetti sani.

Tratto da Donder et al, 2020.

Lo studio ha inoltre evidenziato una correlazione anche tra i livelli ematici della proteina e la durata della malattia o l'età del soggetto, compatibile con il crescente grado di infiammazione [7].

Nello studio condotto da Bellaver e colleghi invece la concentrazione di YKL-40 è stata quantificata tramite ELISA nei biofluidi di pazienti affetti da AD.

Come riportato in **Figura 5** l'analisi è stata eseguita su 14 coorti di pazienti che presentavano la patologia, evidenziando un significativo aumento dei livelli della proteina nel LCS rispetto alle coorti di controllo [4]. Ulteriori analisi sono state eseguite suddividendo i pazienti in base al criterio di diagnosi della patologia evidenziando in ambedue i gruppi un aumento del livello di YKL-40 nel LCS.



**Figura 5:** Livelli di YKL-40 nel LCS e nel sangue in pazienti affetti da AD a confronto con soggetti sani. (A) Livelli di GFAP nel LCS relativi a tutte le coorti, (B-C) Livelli di GFAP nel LCS di coorti divise in base al criterio di diagnosi.

Tratto da Bellaver et al, 2021.

Nonostante i risultati ottenuti la correlazione fra YKL-40 e la fisiopatologia nel AD è ancora poco conosciuta [4]. Oltre a ciò, anche in questo studio, è dimostrato che i livelli di YKL-40 nel LCS aumentano proporzionalmente all'età, diminuendo il suo potenziale come biomcatore [4]. Indubbiamente i livelli di YKL-40 nel LCS aumentano a seguito di un'attivazione astrocitaria ma, anche per questa proteina, non si è riusciti a dimostrarne la specificità in relazione ad una patologia nei casi riportati.

## **Capitolo 3: Biomarcatori veicolati da esosomi**

### **3.1: Vescicole extracellulari: gli esosomi**

Gli esosomi sono vescicole secrete da varie tipologie cellulari che si trovano in diversi biofluidi e, assieme a microvescicole e ai corpi apoptotici, fanno parte della famiglia delle vescicole extracellulari. Inizialmente si pensava che la loro funzione principale fosse quella di esportare sostanze nocive per la cellula. Diversi studi hanno però dimostrato che essi svolgono un ruolo chiave anche nella comunicazione fra le cellule, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, sia a livello locale che sistemico.

Gli esosomi sono vescicole di piccole dimensioni (30–200 nm) la cui membrana a doppio strato è di composizione prettamente proteica e lipidica. Le principali proteine di membrana e citosoliche di cui sono composti sono: membri della famiglia delle tetraspanine (CD9, CD63 e CD81), il complesso di smistamento endosomiale richiesto per le proteine di trasporto (ESCRT) (Alix, TSG101), integrine, proteine da shock termico (Hsp), actina e flottiline [8]. Nello studio riportato di seguito infatti sono stati usati i marcatori specifici di superficie Alix e CD-63 per l'identificazione degli esosomi [9]. La composizione proteica di membrana degli esosomi è molto importante in quanto garantisce il riconoscimento specifico delle cellule bersaglio dell'esosoma da parte delle cellule bersaglio, indispensabile nella comunicazione intercellulare [8]. L'enorme potenziale degli esosomi è dato dalla grande varietà di molecole, che possono trasportare, che possono fungere da possibili biomarcatori. Nel paragrafo seguente verranno presi in esame i microRNA (miRNA) rilasciati da astrociti reattivi.

La capacità degli esosomi di regolare la comunicazione cellula-cellula, di oltrepassare la barriera ematoencefalica, la loro biodistribuzione e la loro capacità di conservare e non degradare il loro contenuto, ha destato interesse in campo medico e di ricerca, portando all'ingegnerizzazione degli esosomi stessi come vettori terapeutici o utilizzandoli come biomarcatori diagnostici [8].

### **3.2: MicroRNA esosomiali rilasciati da astrociti reattivi**

Un'altra classe di prodotti della reattività astrocitaria è rappresentata dai miRNA.

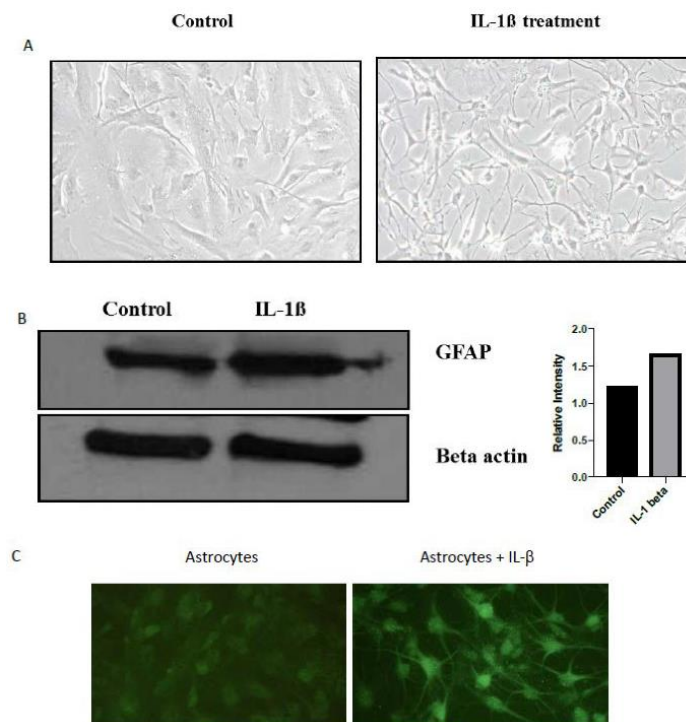
I miRNA sono una famiglia di molecole di RNA di piccole dimensioni, non codificanti e a singolo filamento, che agiscono come regolatori dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale spesso trasportati all'interno degli esosomi [9]. In particolare studi recenti sembrerebbero sottolineare un coinvolgimento diretto dei miRNA nella

regolazione della neuroinfiammazione alla base di diversi disturbi neurologici quale, ad esempio, AD [9].

I miRNA sono stati infatti indicati come importanti molecole di segnalazione cellulare e sono potenziali biomarcatori diagnostici e bersagli terapeutici per varie malattie, compresi i disturbi neurologici [9].

Lo studio di seguito riportato è stato tra i primi ad identificare ed indagare la composizione degli esosomi rilasciati dagli astrociti attivati andando a confrontarli con i miRNA esosomiali prodotti da astrociti mantenuti in condizioni fisiologiche [9].

Astrociti fetali umani, differenti dagli astrociti maturi nell'espressione di alcuni geni, sono stati trattati con IL-1 $\beta$ , una citochina usata per promuoverne l'attivazione, verificata poi con immunoreattività per GFAP (**Figura 6**) [9].

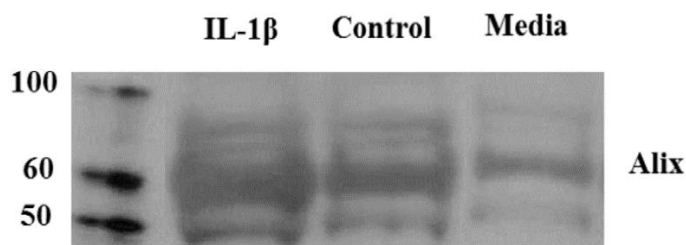


**Figura 6:** (A) Astrociti fetali umani trattati con IL-1 $\beta$  e controllo. (B) Western blot mostra un aumento di GFAP negli astrociti trattati. (C) Immunofluorescenza che mostra l'espressione di GFAP a confronto fra astrociti trattati e controllo.

Tratto da Bhomia et al, 2020.

Una volta ottenuti gli astrociti reattivi si è proceduto all'isolamento dei prodotti esosomiali mediante filtrazione e ultracentrifugazione [9]. Come controllo sono stati isolati esosomi da astrociti mantenuti in condizioni fisiologiche [9]. Per identificare l'effettiva presenza degli esosomi è stata

valutata la presenza del marcatore superficiale Alix ed è stato eseguito un Western blot evidenziando un maggiore quantitativo di esosomi prodotti dagli astrociti attivati rispetto a quelli prodotti dal gruppo di controllo. (**Figura 7**) [9].



**Figura 7:** Western blot su esosomi rilasciati da astrociti trattati e controllo. Tratto da *Bhomia et al, 2020*.

L'analisi dei miRNA contenuti negli esosomi ha portato all'identificazione di tre gruppi: miRNA prodotti esclusivamente dagli astrociti attivati, miRNA la cui concentrazione aumenta a seguito del trattamento con IL-1 $\beta$  negli astrociti attivi ma che sono comunque prodotti anche da astrociti a riposo in condizioni fisiologiche e miRNA specifici degli astrociti a riposo [9]. In totale 5 miRNA sono stati prodotti esclusivamente da astrociti attivi 22 sono stati espressi in modo differenziale dagli astrociti attivati rispetto a quelli a riposo e 26 sono risultati specifici per gli astrociti a riposo [9].

Lo studio riportato ha dunque dimostrato che una condizione neuroinfiammatoria o di stress neuronale porta al rilascio, da parte degli astrociti reattivi, di vescicole esosomiali contenenti alcuni miRNA specifici. Come evidenziato però, la ricerca è stata svolta in condizioni di neuroinfiammazione generale e non specifica relativamente ad una patologia neurodegenerativa e, ad oggi, non è ancora stata dimostrata questa specificità. Lo studio riportato tuttavia ha sottolineato l'enorme potenzialità rappresentata dai miRNA, quali possibili biomarcatori prodotti dagli astrociti reattivi e veicolati all'interno di esosomi.

## **Capitolo 4: Biomarcatori rilevabili tramite imaging**

### **4.1: Tecniche di imaging: ibridi PET/MR**

La tomografia ad emissione di positroni (PET) è una tecnica di neuroimmagine che gode di una buona risoluzione spaziale (risoluzione spaziale minima di un cubo di lato pari a 5 mm) ma non di buona risoluzione temporale in quanto, una volta somministrato il radiofarmaco, bisogna aspettare che esso si leghi al bersaglio prima di eseguire l'esame. A differenza di altre tecniche di neuroimmagine, permette di ottenere un segnale di tipo metabolico in quanto può andare ad indagare, ad esempio, il consumo di glucosio a livello cellulare.

La PET è una tecnica di neuroimmagine di tipo emissivo, dove la sorgente del segnale viene dall'interno dell'organismo preso in esame e viene rilevata mediante le radiazioni emesse da un radiofarmaco, copia energeticamente instabile di un elemento chimico che emette energia per tornare alla stabilità, somministrato precedentemente all'acquisizione delle immagini.

La tomografia ad emissione di positroni può essere usata per identificare la presenza di masse tumorali, in quanto essi richiedono una maggiore quantità di glucosio per la loro sopravvivenza, ma può anche dare informazioni riguardo a patologie neurodegenerative come AD grazie alla possibilità di marcare radioattivamente, mediante il tracciante [18F] – THK5351 (trattato nel prossimo paragrafo), le placche di  $\beta$ -amiloide che si formano in presenza di questa patologia.

La risonanza magnetica (RM) è invece un'altra tecnica di imaging che viene usata in radiologia, essa sfrutta le oscillazioni dei campi magnetici e le onde radio per fornire immagini degli organi o dei tessuti del paziente (risoluzione spaziale:  $1.5 \times 1.5 \times 4 \text{ mm}^3$ ). La risonanza magnetica viene usata principalmente in campo diagnostico, poichè, a differenza delle normali radiografie, non utilizza radiazioni ionizzanti. È una delle tecniche maggiormente utilizzata per ottenere immagini del cervello di pazienti con malattie neurodegenerative, per monitorarne il decorso o un eventuale processo terapeutico.

Nonostante la continua evoluzione, sia nel settore diagnostico che prognostico, non sono ancora presenti in campo clinico tecniche di imaging capaci di rilevare l'attivazione astrocitaria. Esistono però degli ibridi PET/MR che rappresentano le tecniche di imaging più avanzate in questo campo [10].

La potenzialità di questi scanner consiste nella loro capacità di sfruttare la specificità funzionale dei radiotraccianti PET e le informazioni multiparametriche che derivano da MR in una singola sessione di acquisizione di immagini e con un singolo esame [10].

#### **4.2: Radiotracciante PET legante la Monoamino ossidasi B**

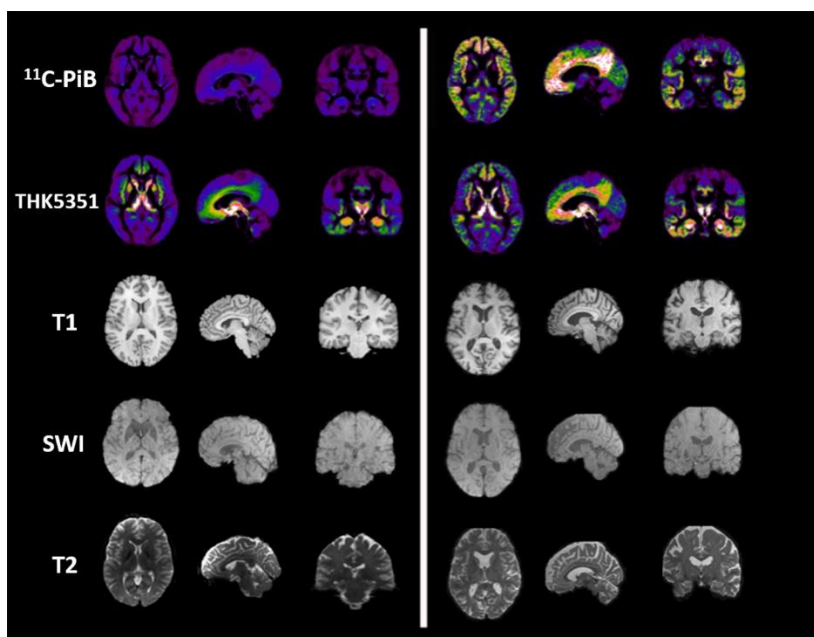
La monoamino ossidasi B (MAO-B), insieme alla monoamino ossidasi A (MAO-A) è uno dei due isoenzimi flavina-dipendenti che intervengono nella deaminazione ossidativa dei neurotrasmettitori come serotonina e dopamina [11]. Questo enzima, formato da 520 amminoacidi, si presenta, in struttura cristallina, come un dimero legato alla membrana esterna mitocondriale [11].

MAO-B viene espresso maggiormente dagli astrociti reattivi, portando ad una condizione di stress a causa della produzione di perossidi di idrogeno [10]. Ad oggi sono stati sviluppati due radiofarmaci leganti MAO-B: uno che



utilizza il carbonio-11, [11C] -L- deprenyl-D2, denominato  $^{11}\text{C}$ -PiB, e uno contenente il fluoro-18, [18F] – THK5351, identificato con il nome THK5351, specifico per gli astrociti [11].

Lo studio qui di seguito riportato ha messo a confronto i risultati ottenuti da un'analisi, eseguita con ibrido PET/MR ed i traccianti precedentemente citati,  $^{11}\text{C}$ -PiB e THK5351, tra un individuo sano, riportato a sinistra nella figura, ed un individuo con diagnosi di AD, riportato a destra nella figura [10]. **(Figura 8)**



**Figura 8:** Immagini PET di proiezioni di cervello sano (sinistra) a confronto con uno affetto da AD (destra).

Tratto da Cavaliere et al, 2020.

Come evidenziato in figura i radiotraccianti sono presenti maggiormente in pazienti affetti da AD, dimostrando una maggiore concentrazione di ligandi, e quindi di astrociti reattivi, in questi soggetti rispetto agli individui di controllo [10]. Sebbene l'aumento dell'espressione di MAO-B a livello cerebrale avvenga a seguito dell'attivazione astrocitaria, non è stato dimostrato che sia una conseguenza specifica di AD [10].

## Capitolo 5: Conclusione

lo scopo di questo elaborato è quello di fornire una panoramica sui possibili biomarcatori, della reattività astrocitaria nel contesto delle patologie neurodegenerative, come ad esempio AD, PD e MS, evidenziando studi già presenti in letteratura. La scoperta di nuovi biomarcatori potrebbe portare all'ottimizzazione di nuove tecniche diagnostiche e favorire la formulazione di un processo terapeutico migliore.

In questa tesi sono stati riportati studi relativi a: biomarcatori indice di attività astrocitaria che possono essere rilevati nei biofluidi come: GFAP, S100B e YKL-40, microRNA astrocitari veicolati da esosomi ed infine i radiotraccianti PET leganti MAO-B.

L'individuazione di un biomarcatore specifico per una patologia neurodegenerativa nei biofluidi, come ad esempio il sangue, permetterebbe di avere a disposizione una tecnica diagnostica rapida, efficace e relativamente poco invasiva.

La principale difficoltà nell'individuazione di una molecola che possa fungere da biomarcatore, come evidenziato negli studi riportati, è la mancanza di specificità.

La condizione di reattività astrocitaria è, di fatto, una risposta alla base di diverse situazioni di stress, ma non è ancora del tutto chiaro se essa sia esclusivamente propatologica. Questo rende ancora più complessa la correlazione fra i suoi prodotti ed una particolare condizione patologica.

Nonostante i continui progressi nello studio delle patologie neurodegenerative, i meccanismi molecolari coinvolti non sono ancora completamente chiari rappresentando quindi un ulteriore ostacolo per l'identificazione di molecole che possano fungere da biomarcatori.

Tuttavia un recente studio basato sulle cellule staminali pluripotenti indotte di origine umana (HiPSC dall'inglese Human induced pluripotent stem cell) ha portato alla definizione di un gruppo di molecole capaci di identificare in modo specifico gli astrociti reattivi [12]. In questo studio sono stati confrontati astrociti derivati da HiPSC mantenuti in condizioni fisiologiche, con astrociti, trattati con proteine umane ricombinanti TNF, e quindi portati ad uno stato di reattività. Sono state evidenziate sei molecole che insieme definiscono una firma proteomica degli astrociti reattivi derivati da HiPSC: la proteina di adesione delle cellule vascolari 1 (VCAM1), il co-stimolatore a cellule T inducibile (ICOSL), la podoplanina (PDPN), l'antigene 2 delle cellule stromali del midollo osseo (BST2), il complesso di istocompatibilità maggiore I-E (HLA-E) e il ligando di morte cellulare programmata 1 (PD-L1) [12]. Tutte queste molecole potrebbero quindi essere usate in futuro come biomarcatori per specifiche patologie neurodegenerative.

Un altro studio ha indagato invece la composizione del proteoma del LCS di topi transgenici, con  $\beta$ -amiloidosi (topi APPPS1) e topi con  $\alpha$ -

sinucleinopatia (topi A30P- $\alpha$ S), rispetto a topi wildtype (topi wt) per identificare possibili molecole che possano fungere da elementi di diagnostica e di controllo della progressione delle malattie neurodegenerative [13]. I risultati ottenuti dimostrano che i livelli di alcune molecole prodotte in condizioni di attivazione microgliale e reattività astrocitaria, caratteristiche particolari di questi topi transgenici, risultano essere più elevati rispetto ai livelli misurati nei topi wt [13]. In particolare, il proteoma del LCS dei topi transgenici mostra una chiara sovrapposizione tra microglia ed astrociti reattivi, in quanto i geni APOE, CSF1, CTSD, CTSB, CTSL e TIMP2 risultano essere tutti sovraregolati. Tali molecole potrebbero quindi rappresentare promettenti biomarcatori per la diagnosi ed il monitoraggio delle patologie neurodegenerative in futuro [13].

L'integrazione di queste scoperte con il continuo progresso delle tecnologie può portare ad un aumento notevole della conoscenza attuale riguardo alla funzionalità e biologia degli astrociti reattivi, facilitando dunque lo sviluppo di terapie precise ed efficaci per le malattie neurodegenerative in cui la reattività astrocitaria è un importante contributore.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Carter SF, Herholz K, Rosa-Neto P, Pellerin L, Nordberg A, Zimmer ER. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med*. 2019 Feb;25(2):77-95. doi: 10.1016/j.molmed.2018.11.006.
2. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* 24, 312–325 (2021). doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4.
3. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010 Nov;5(6):463-6. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177. PMID: 20978388; PMCID: PMC3078627.
4. Bellaver B., Ferrari-Souza J.P., Uglione da Ros L., Carter S.F., Rodriguez-Vieitez E., Nordberg A., Pellerin L., Rosa-Neto P., Leffa D.T., Zimmer E.R. *Neurology* Jun 2021, 96 (24) e2944 e2955; DOI: 10.1212/WNL.0000000000012109.
5. Petzold A. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain Res*. 2015 Mar 10;1600:17-31. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.027. Epub 2014 Dec 25. PMID: 25543069.
6. Michetti F, D'Ambrosi N, Toesca A, Puglisi MA, Serrano A, Marchese E, Corvino V, Geloso MC. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem*. 2019 Jan;148(2):168-187. doi: 10.1111/jnc.14574. Epub 2018 Nov 12. PMID: 30144068.
7. Dönder A, Özdemir HH. Serum YKL-40 levels in patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2021 Sep;79(9):795-798. doi: 10.1590/0004-282X-ANP-2020-0326. PMID: 34669813.
8. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 2021 Apr 23;19(1):47. doi:10.1186/s12964-021-00730-1. PMID: 33892745; PMCID: PMC8063428
9. Gayen, M.; Bhomia, M.; Balakathiresan, N.; Knollmann-Ritschel, B. Exosomal MicroRNAs Released by Activated Astrocytes as Potential Neuroinflammatory Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 2312. doi.org/10.3390/ijms21072312.
10. Cavaliere C, Tramontano L, Fiorenza D, Alfano V, Aiello M, Salvatore M. Gliosis and Neurodegenerative Diseases: The Role of PET and MR Imaging. *Front Cell Neurosci*. 2020 Apr 2;14:75. doi: 10.3389/fncel.2020.00075.
11. Binda C, Newton-Vinson P, Hubálek F, Edmondson DE, Mattevi A. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat Struct Biol*. 2002 Jan;9(1):22-6. doi: 10.1038/nsb732.

12. Labib D, Wang Z, Prakash P, Zimmer M, Smith MD, Frazel PW, Barbar L, Sapor ML, Calabresi PA, Peng J, Liddel SA, Fossati V. Proteomic Alterations and Novel Markers of Neurotoxic Reactive Astrocytes in Human Induced Pluripotent Stem Cell Models. *Front Mol Neurosci*. 2022 May 3;15:870085. doi: 10.3389/fnmol.2022.870085.
13. Eninger T, Müller SA, Bacioglu M, Schweighauser M, Lambert M, Maia LF, Neher JJ, Hornfeck SM, Obermüller U, Kleinberger G, Haass C, Kahle PJ, Staufenbiel M, Ping L, Duong DM, Levey AI, Seyfried NT, Lichtenthaler SF, Jucker M, Kaeser SA. Signatures of glial activity can be detected in the CSF proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Jun 14;119(24):e2119804119. doi: 10.1073/pnas.2119804119.