

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1. IL MORBO DI ALZHEIMER.

“Immaginate il vostro cervello come una casa illuminata: Ora immaginate che qualcuno spenga le luci una ad una; questo è quello che fa l'Alzheimer. Spegne la luce in una stanza e poi nell'altra e le idee, le emozioni e la memoria si affievoliscono e cessano del tutto. Sfortunatamente, come sanno bene tutti i familiari dei malati, non c'è ancora nessun modo per evitare che le luci si spengano, almeno per ora”

Madeleine Nash, Time, luglio 2000.

1.1 L'Alzheimer Disease (AD). [www.alz.org, www.alzheimer.it]

La malattia di Alzheimer è un processo degenerativo che distrugge lentamente e progressivamente le cellule del cervello provocando un declino progressivo e globale delle funzioni intellettive associato ad un cambiamento negativo della personalità e del comportamento relazionale.

Prende il nome dal neurologo tedesco Alois Alzheimer che nel 1907 ne descrisse per primo i sintomi e gli aspetti neuropatologici, come le placche e gli aggregati neuro-fibrillari.

L'AD è la più comune causa di demenza: rappresenta, infatti, tra il 50 ed il 70% di tutte le demenze esistenti; è stato stimato che questa malattia colpisca circa il 5% della popolazione sopra i 65 anni e tra il 20 ed il 40 % della popolazione sopra gli 85 anni. In Italia oggi il numero di malati di Alzheimer è di 450.000 (4.000.000 negli Stati Uniti); si prevede, però, che questo numero possa raddoppiare nell'anno 2020.

Il prolungamento della vita media nella nostra società e l'avanzamento delle metodologie di diagnosi giustificano l'aumento del numero di casi diagnosticati negli ultimi anni.

La patologia inizialmente si manifesta con alcuni sintomi premonitori tra i quali: perdita di memoria che compromette le capacità lavorative, difficoltà nelle attività quotidiane, problemi di linguaggio, disorientamento nel tempo e nello spazio, diminuzione della capacità di giudizio, difficoltà nel pensiero astratto, cambiamenti di umore, di comportamento o di personalità e mancanza di iniziativa.

In una seconda fase l'amnesia diviene più pronunciata e compare insieme ad agnosia (difficoltà di riconoscere le persone), aprassia (difficoltà nel

maneggiare gli oggetti) ed afasia (problemi del linguaggio); subentra anche la probabilità di avere attacchi epilettici e mioclono.

La fase terminale può sopraggiungere, nei casi più gravi, dopo soli tre anni, ma, in generale, dopo una ventina di anni; in questo stadio della malattia si assiste ad una disintegrazione delle funzioni vitali, apatia ed inerzia cui segue la morte per patologie collaterali, quali quelle a carico dell'apparato respiratorio.

E' improbabile che si possa far risalire la malattia ad un'unica causa: è verosimile che sia un insieme di fattori, con incidenza diversa da persona a persona, a determinarne lo sviluppo.

Tra i fattori di rischio identificati dalla ricerca negli anni si annoverano: l'età, i fattori genetici (in alcune famiglie l'AD si presenta come malattia genetica dominante) ed i traumi cranici subiti ad un'età superiore ai cinquant'anni.

La diagnosi sicura di Alzheimer può essere eseguita solo post mortem su tessuti cerebrali. Per questo motivo molti sforzi sono diretti nello sviluppo di nuove metodologie di diagnosi [Rapoport *et al.* 2000; Wenfenack *et al.* 2000; Galasko www.medscape.com].

1.2 Neuropatologia. [Spillantini *et al.* 1999]

Il cervello del malato di AD va incontro ad una serie di “modifiche patologiche”. La causa determinante della malattia è la morte dei neuroni e delle sinapsi in molte aree del sistema nervoso centrale.

Vari studi hanno dimostrato che l'anatomia del processo neurodegenerativo coinvolge soprattutto il sistema limbico e la corteccia associativa, indicando una certa vulnerabilità dei sistemi coinvolti nella memoria e nell'apprendimento.

Alcuni sistemi neuronali sono maggiormente colpiti dalla malattia, per esempio il sistema colinergico del prosencefalo basale. In queste regioni è stata riscontrata una diminuzione di marcatori colinergici, tra cui l'acetilcolina (ACh), la noradrenalina, la serotonina, la dopamina, il glutammato e la sostanza P.

Le manifestazioni cliniche della malattia sono dunque probabilmente dovute alla diminuzione di questi neurotrasmettitori.

Al momento dell'autopsia è possibile rilevare due tipi di depositi caratteristici: le placche amiloidi extracellulari e gli aggregati intracellulari neurofibrillari.

Per questo motivo in questi ultimi dieci anni sono stati studiati due meccanismi in cui sono coinvolti due elementi: la proteina tau, che costituisce gli aggregati neurofibrillari ed il peptide β -amiloide, il costituente principale delle placche senili.

La proteina tau e gli aggregati neurofibrillari. [Schorderet 1995, www.alzheimer.it]

Gli aggregati neurofibrillari intracellulari sono una manifestazione significativa della malattia. La microscopia elettronica mostra che essi sono costituiti da filamenti elicoidali accoppiati (PHF, *Paired Helical Filaments*) che derivano dalle cosiddette MAP (*Microtubule Associated Protein*).

L'elemento principale delle PHF è la proteina tau che è presente anche in assenza della patologia, essendo coinvolta nella struttura cellulare.

I corpi sferici dei neuroni sani sono coperti dai neuriti che formano collegamenti con le altre cellule. Questi neuriti avvolgono una struttura interna chiamata microtubulo, che dà al neurone la sua forma e serve da sistema di trasporto di sostanze nutritive e chimiche: il collante che tiene insieme tutto questo sistema è, appunto, la proteina tau. Le molecole di tau sono strettamente legate ai lati dei microtubuli e li rafforzano; ma quando interviene la malattia di Alzheimer, le molecole di tau si staccano dai microtubuli e si uniscono formando i grovigli. Contemporaneamente, i microtubuli si disgregano e i neuroni muoiono.

In pazienti affetti da AD la tau risulta essere iperfosforilata in tutte e sei le isoforme possibili.

L'iperfosforilazione della proteina tau riduce la sua capacità di legarsi ai microtubuli; la tau dunque si accoppierebbe in dimeri e questi, in numero variabile da quattro a sette, costituirebbero il nucleo degli aggregati anomali PHF [Friedhoff *et al.* 1998]; questi aggregati porterebbero al collasso dei microtubuli e ad una riduzione del trasporto assonale, che è invece fondamentale nel trasferimento di sostanze di natura trofica tra corpo cellulare e sinapsi.

L'efficienza di questo trasporto è necessaria per mantenere buone connessioni neuronali; quando il trasporto è alterato i neuroni degenerano e la rete neuronale, coinvolta nelle varie funzioni cognitive e vitali, è interrotta provocando la sintomatologia della patologia.

Un gran numero di osservazioni sperimentali ha evidenziato la correlazione diretta tra gli ammassi neurofibrillari ed il progredire della

demenza, mentre è possibile trovare placche amiloidi in soggetti anziani normali. Probabilmente è significativo il fatto che questi ammassi neurofibrillari siano intracellulari e riescano così ad indurre la morte del neurone. In forme familiari di demenza sono state identificate mutazioni proprio a carico del gene della proteina tau, mentre non sono stati trovati depositi della proteina A β .

Il peptide b-amiloide e meccanismi cellulari ad esso correlati. [Schorderet 1995; Rochet *et al.* 2000; Spillantini 1999; Koo *et al.* 2004; Citron 2004]

Le placche amiloidi, presenti nei vasi sanguigni e nelle meningi, sono costituite da aggregati di assoni, dendriti e cellule gliali alterate, che avvolgono un nucleo costituito dal peptide β -amiloide (A β).

Tutti produciamo l'A β , talvolta però questo forma degli aggregati detti fibrille, che poi si uniscono insieme creando le placche amiloidi.

La correlazione tra densità delle placche e gravità della malattia è molto incerta. Per di più simili placche si ritrovano nella maggior parte delle persone anziane. Tuttavia la loro presenza massiccia nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale è specifica dei malati di Alzheimer.

Alcuni studi [Rochet *et al.* 2000; Harper *et al.* 1999] hanno evidenziato come la formazione della fibrilla amiloide passi per un intermedio parzialmente ordinato costituito da foglietti β , che evolve verso un nucleo molto ricco di foglietti β , che, a sua volta, porta alla formazione del cosiddetto "*prefibrillar intermediate*" ed infine della fibrilla. Sono molte le evidenze per le quali il "*prefibrillar intermediate*" potrebbe costituire una delle specie patogene nell'Alzheimer.

Recentemente però l'attenzione è stata spostata sul peptide A β nello stato non fibrillare o oligomero, in quanto gli aggregati e le fibrille deposte nelle placche senili non sono direttamente correlate con il declino cognitivo. Il peptide solubile A β sembra invece essere estremamente tossico e gli oligomeri potrebbero essere correlati con l'iniziale sintomatologia dell'AD.

L' A β è un peptide che ha un normale ruolo fisiologico dal momento che interagisce con la matrice extracellulare per promuovere la crescita neuritica [Koo *et al.* 1993]. E' generata intracellularmente dal taglio proteolitico della proteina di membrana detta APP (*Amyloid Precursor Protein*) che, a sua volta, nei neuroni sani, è deputata a svolgere importanti funzioni quali l'adesione alla matrice extracellulare dei dendriti in crescita.

Utilizzando tecniche di clonaggio e di sequenziamento di c-DNA che codifica per l'A β , è stato possibile comprendere come l'A β derivi dall'APP.

Vi sono tre siti principali e specifici di taglio proteolitico dell'APP nella regione contenente la sequenza dell'A β . Uno di questi è il sito di taglio dell' α -secretasi, che dà luogo ad un peptide innocuo. Gli enzimi β -secretasi (o BACE) e γ -secretasi contribuiscono insieme a generare l'A β (Fig1.1).

Stanno aumentando le evidenze sperimentali che l'isoforma di A β contenente 42 residui, A β 42, sia la specie patogena.

La γ -secretasi è un complesso enzimatico che è collocato nella membrana plasmatica e nel reticolo endoplasmatico dei neuroni; esso è costituito dalle preseniline-1 e -2, che sono proteine multifunzionali assimilabili alle aspartilproteasi, dalla nicastrina, dalla Aph-1 e dalla PEN-2 (Fig1.2).

Questo complesso enzimatico ha come substrato la proteina APP, la proteina Notch ed altre proteine. Il taglio di Notch porta alla formazione di un peptide, NICD, che entra nel nucleo e regola l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo del cervello e nella plasticità di neuroni di organismi adulti. Anche l'altro peptide generato dal taglio di APP, detto frammento citoplasmatico può dirigersi nel nucleo e regolare l'espressione genica.

Mutazioni a carico della presenelina-1, che causano la manifestazione di AD precoce, aumentano l'attività della γ -secretasi e la produzione di A β ed inoltre perturbano il bilancio di calcio del reticolo endoplasmatico. Tutto questo porta alla degenerazione cellulare causata dallo stress ossidativo della membrana cellulare [Mattson 2003].

E' molto recente [Lustbader *et al.* 2004] uno studio in cui si sostiene che l'A β interagisca con un enzima del mitocondrio chiamato ABAD portando alla distruzione del mitocondrio stesso ed, infine, alla morte dell'intera cellula neuronale.

Tutte le mutazioni genetiche che causano AD familiare influiscono sul substrato APP o sul complesso proteasico delle preseneline e sono associate ad un aumento selettivo del peptide A β 42 o del livello generale di A β .

L'inevitabilità dell'AD in pazienti con sindrome di Down che presentano trisomia del cromosoma 21 ha permesso subito di individuare la mutazione a carico del gene dell'APP presente sul cromosoma 21.

Mutazioni genetiche responsabili di forme familiari precoci di AD sono invece a carico del cromosoma 14.

Di contro, mutazioni sul cromosoma 19 e la concomitante espressione di apolipoproteine E4 (ApoE4) dal gene APOE (allele ϵ 4) sono associate a sporadiche e tardive forme di AD familiare; non è chiaro il meccanismo con il quale ApoE4 aumenta il rischio di AD, ma potrebbe influenzare

negativamente l'eliminazione di A β , alterarne l'aggregazione o influenzare il metabolismo del colesterolo ed, indirettamente, A β .

Tra gli svariati studi che si stanno conducendo sulla componente genetica dell'AD, degna di nota è la scoperta del gene codificante per la nicastrina, il cui nome è dovuto alla città calabrese Nicastro, di cui erano originarie le persone oggetto, ben 40 anni fa, del primo studio genetico sulla forma familiare dell'AD [Yu *et al.* 2000].

Studiando infatti le forme genetiche di AD ad esordio precoce, si è isolato un gene coinvolto localizzato sul cromosoma 1; questo codifica per una glicoproteina delle membrane neuronali, la nicastrina che, come già accennato, è una glicoproteina, che appartiene al gruppo delle preseniline. Per spiegare la funzione della nicastrina sono stati ipotizzati due modelli molecolari: il primo attribuisce alla nicastrina un ruolo nel legare i substrati nel complesso preseniline/ γ -secretasi, il secondo, invece, vede la nicastrina come possibile regolatore dell'attività della γ -secretasi. Nelle forme mutate la nicastrina potrebbe essere causa di alcune forme di Alzheimer, aumentando la secrezione dei peptidi mutati A β 40 ed A β 42.

Dalla panoramica appena fatta appare evidente che nel complesso *puzzle* appena descritto, molte sono le proteine il cui funzionamento dovrà essere approfondito, prime fra tutte le preseniline, per chiarire il loro coinvolgimento nell'insorgenza dell'AD.

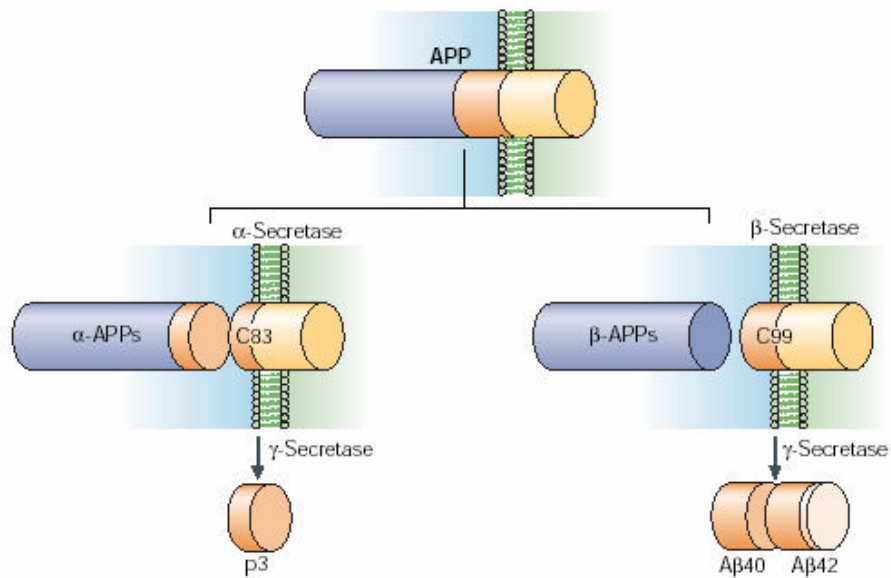


Fig.1.1 APP (*Amyloid Precursor Protein*) e suoi metaboliti. La proteina di transmembrana (la transmembrana è indicata in verde) può essere processata in due modi: dall'α-secretasi e dalla β-secretasi. L' α-secretasi la taglia nel mezzo della regione β (in arancione) per rilasciare un peptide solubile α-APP (in blu). La parte C-terminale C83 è metabolizzata dalla γ-secretasi originando il peptide p3. La β-secretasi rilascia il peptide solubile β-APP (in blu) . la parte C-terminale C99 viene scissa dalla γ-secretasi in vari punti portando alla formazione del peptide Aβ40 e di quello patogeno Aβ42. Il taglio della γ-secretasi porta anche alla formazione del AICD (*APP Intracellular Domain*) che può avere un ruolo nella regolazione della trascrizione.

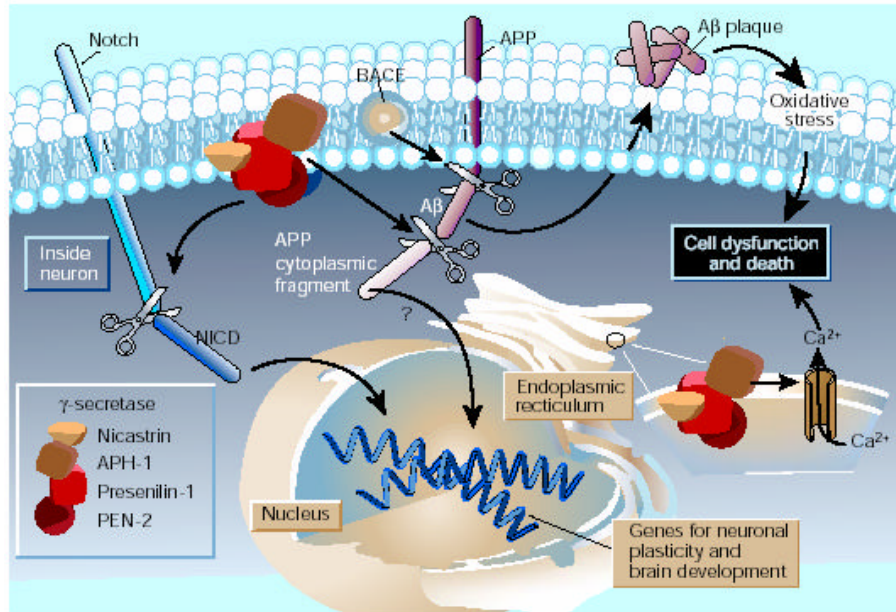


Fig.1.2 Rappresentazione del ruolo del complesso enzimatico della γ -secretasi (riquadro in basso a sinistra) sia nello sviluppo del cervello, che nell'insorgenza dell'Alzheimer.