



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE  
XX CICLO**

**"EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ROLIPRAM  
SULL'ESPRESSIONE DELLA pCREB (CAMP RESPONSE ELEMENT-  
BINDING PROTEIN) E DEL BDNF IN MODELLI ANIMALI PER LO  
STUDIO DELLA COREA DI HUNTINGTON "**

***Dott.ssa CARMELA GIAMPÀ***

*Tutor: Dr.ssa F.R. Fusco*

*Coordinatore: Prof. G. Bernardi*

## **ABSTRACT**

Recent advanced has shown that the activity of cAMP responsive element-binding protein (CREB) and of CREB-binding protein (CBP) is decreased in Huntington's disease (HD) (Steffan et al., 2000; Rouaux et al., 2004). Such decrease is thought to reflect the impaired energy metabolism in a HD mouse model, where a decline in striatum cAMP levels has been observed. Increased levels of CREB have also been demonstrated to exert neuroprotective functions(Lonze et al 2002). Interestingly, one of the CREB target genes is the brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Lonze and Ginty, 2002).

The phosphodiesterase type IV inhibitor rolipram increase CREB phosphorylation. Such drugs has a protective effect in global ischemia and embolism in rats. Moreover, rolipram-induced PDE4 inhibition was shown to enhance BDNF induction in rat hippocampus (Fujimaki et al, 2000)Our study aimed at investigate first the distribution of pCREB in the neuronal subpopulations of the striatum in normal rats compared to the HD model of quinolinic acid lesion and second the neuroprotective effect of the rolipram in our rat model of HD and in R6/2 mutant mice. Our results show that activated CREB levels decrease progressively in projection neurons and parvalbumin (PARV) and calretinin (CALR) interneurons, whereas such levels remain stable in cholinergic and somatostatinergic interneurons. We found also that rolipram showed to be effective in increasing significantly the levels of activated CREB and BDNF in the striatal spiny neurons, which accounts mostly for its beneficial effect in our rodent model of excitotoxicity and R6/2 mice. Our findings showed that rolipram could be considered as a valid therapeutic approach for HD.

Key words: Huntington's disease, CREB, BDNF, confocal microscopy, transgenic mouse

## ABSTRACT

Recenti studi hanno dimostrato che l'attività della CREB (cAMP responsive element-binding protein) e la CBP (CREB-binding protein) diminuiscono in modelli di corea di Huntington (Steffan et al., 2000; Roaux et al., 2004). È stato osservato che questo effetto può tradursi in un danneggiamento del metabolismo energetico dovuto anche ad una diminuzione dei livelli di cAMP nello striato di questi modelli. È stato anche dimostrato che aumenti dei livelli di CREB fosforilata hanno effetti neuroprotettivi (Lonze et al., 2002). Il gene che codifica per il fattore neurotrofico BDNF è attivato dalla CREB (Lonze e Ginty, 2002). Il rolipram, inibitore della fosfodiesterasi di tipo IV, è capace di indurre un aumento dei livelli di pCREB e BDNF (Fujimaki et al., 2000). È stato dimostrato che questo farmaco ha effetti benefici in condizioni di ischemia. L'obiettivo di questo studio è stato quello di investigare prima l'espressione della pCREB nella popolazione striatale in relazione alla loro diversa suscettibilità alla patologia, questi studi sono stati condotti su animali di controllo e modelli sperimentali quali ratti lesionati con acido quinolinico (QA). Il passo successivo è stato studiare gli effetti della somministrazione di rolipram sulla CREB e il BDNF nei topi transgenici R6/2 e nei ratti lesionati con QA. Il nostro studio ha dimostrato che l'attivazione della CREB diminuisce nei neuroni di proiezione e negli interneuroni striatali parvalbuminergici e calretininergici in ratti QA, invece i livelli di pCREB rimanevano stabili negli interneuroni più resistenti, quelli colinergici e somatostatiniergici. Questa ricerca ha anche dimostrato che i topi R6/2 e i ratti lesionati con QA entrambi trattati con rolipram mostravano dei livelli di attivazione di CREB maggiore rispetto al controllo. Anche l'espressione del BDNF aumenta nei topi R6/2. Questi risultati fanno pensare al rolipram come un potenziale approccio terapeutico per la corea di huntington.

Key words: Huntington's disease, CREB, BDNF, confocal microscopy, transgenic mouse

# INDICE

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>6</b>
<b>1. ASPETTI GENERALI SULLA COREA DI HUNTINGTON.....</b>	<b>6</b>
1.1 <i>EZIOPATOLOGIA</i> .....	6
1.2 <i>NEUROPATOLOGIA</i> .....	7
1.2.1 Anatomia patologica macroscopica.....	7
1.2.2 Anatomia patologica microscopica.....	8
1.3 <i>ASPETTI GENETICI</i> .....	11
1.4 <i>MECCANISMI MOLECOLARI DELLA NEURODEGENERAZIONE</i> .....	11
1.4.1 Huntingtina, BDNF ed eccitotossicità .....	14
<b>2. FUNZIONE E REGOLAZIONE DEI FATTORI TRASCRIZIONALI DELLA CREB NEL SISTEMA NERVOSO.....</b>	<b>21</b>
2.1 <i>CARATTERISTICHE STRUTTURALI DELLA CREB</i> .....	21
2.2 <i>CREB E I GENI bersaglio</i> .....	23
2.3 <i>SEGNALI E REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA CREB</i> .....	24
2.4 <i>MECCANISMI CHE CONDUCONO ALLA FOSFORILAZIONE DELLA CREB</i> .....	25
2.5 <i>TRASCRIZIONE GENICA CREB-MEDIATA</i> .....	27
2.6 <i>I FATTORI DI CRESCITA E LA CREB</i> .....	28
2.7 <i>CREB, CAMP E FOSFODIESTERASI TIPO IV</i> .....	29
2.8 <i>FUNZIONI GENERALI DELLA CREB</i> .....	30
2.8.1 CREB e Sviluppo del Sistema Nervoso.....	32
2.8.2 La CREB nell'Apprendimento, nella Memoria e nNella Plasticita' Sinaptica.....	32
2.8.3 CREB nella Neuroprotezione e nella Malattia .....	33
2.8.4 La CREB nella Corea di Huntington .....	36
<b>LA NOSTRA RICERCA.....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>40</b>
3.1 <i>LESIONE ECCITOTOSSICA E SOMMINISTRAZIONE DEL FARMACO</i> .....	40
3.2 <i>COLONIA DEI TOPI TRANSGENICI R6/2</i> .....	41
3.2.1 <i>GENOTIPIZZAZIONE DELLA COLONIA R6/2</i> .....	42
3.3 <i>IMMUNOISTOCHEMICA</i> .....	44
3.3.1 <i>IMMUNOFLUORESCENZA PER L'ANALISI DELL'ATTIVAZIONE DELLA CREB</i> .....	44
3.3.2 <i>Quantificazione dell'espressione della CREB fosforilata</i> .....	45
3.4 <i>ANALISI DEL BDNF NEI NEURONI DI PROIEZIONE STRIATALE</i> .....	46

3.5 ANALISI STATISTICA.....	47
<b>RISULTATI .....</b>	<b>49</b>
4.1 ANALISI SEMIQUANTITATIVA DELLA PCREB NEL MODELLO QA .....	49
4.2 EFFETTI DEL ROLIPRAM NEL MODELLO QA.....	49
4.2.1 EFFETTI DEL ROLIPRAM SULLA FOSFORILAZIONE DELLA CREB NEI RATTI LESIONATI.....	50
4.2.2 EFFETTI DEL ROLIPRAM SULL'ESPRESSIONE DEL BDNF NEI RATTI LESIONATI.....	50
4.3 EFFETTI DEL ROLIPRAM NEL MODELLO MURINO R6/2 .....	51
4.3.1 ANALISI SEMIQUANTITATIVA DELLA PCREB NEI TOPI R6/2 DOPO TRATTAMENTO CON ROLIPRAM.....	51
4.3.2 ANALISI SEMIQUANTITATIVA DEL BDNF IN TOPI R6/2 DOPO TRATTAMENTO CON ROLIPRAM.....	51
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>52</b>
5.1 ESPRESSIONE DELLA PCREB E DEL BDNF NEL MODELLO ECCITOTOSSICO DA QA DOPO TRATTAMENTO CON ROLIPRAM.....	52
5.2 ANALISI DEI LIVELLI DI pCREB E DI BDNF NEI TOPI R6/2 DOPO TRATTAMENTO CON ROLIPRAM.....	55
<b>IMMAGINI.....</b>	<b>58</b>
<b>APPENDICE A - MODELLI ANIMALI DI COREA DI HUNTINGTON .....</b>	<b>66</b>
<i>RATTO: MODELLI CHIRURGICI</i> .....	66
MODELLO CHIRURGICO DA LESIONI ECCITOTOSSICHE .....	66
MODELLO DA SOMMINISTRAZIONE INTRAMUSCOLARE DI ACIDO 3 NITROPROPIONICO .....	68
<i>MODELLI GENETICI</i> .....	69
TOPI TRANSGENICI.....	69
MODELLI ANIMALI CON FRAMMENTI POLY-Q INSERITI MEDIANTE VIRUS .....	73
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>74</b>

# INTRODUZIONE

---

## 1. ASPETTI GENERALI SULLA COREA DI HUNTINGTON

### 1.1 EZIOPATOLOGIA

La Corea di Huntington è una malattia degenerativa ereditaria interessante i nuclei grigi centrali e la corteccia cerebrale; essa si caratterizza per lo sviluppo progressivo, nel soggetto adulto, di movimenti coreici e di un deterioramento delle funzioni superiori. Le prime descrizioni di caratteristiche cliniche riferibili a questa grave patologia risalgono al Sedicesimo secolo. E' solo nel 1872 che la malattia viene descritta in modo esauriente da George Huntington, un giovane medico di Long Island, New York, durante una conferenza sulla corea di Sydenham, e da quel momento, la malattia assunse il nome di corea ( dal latino choreus, dal greco chorus, danza) di Huntington.

Le caratteristiche fondamentali da Lui descritte si possono riassumere in una triade comprendente: disordini del movimento, per lo più di natura coreica; disturbi affettivi, con tendenza al suicidio e deficit cognitivi. La condizione viene ereditata come tratto autosomico dominante, per cui la metà dei figli di una persona affetta saranno colpiti. . Poiché la HD si trasmette attraverso un gene dominante autosomico monoibrido a completa penetranza, la mutazione di un allele è sufficiente a causare la patologia. L'inizio clinico si colloca tra i 30 ed i 50 anni e progredisce, lentamente ma inesorabilmente, per circa 15-20 anni, portando l'individuo all'invalidità totale. L'esordio può anche avvenire prima dei 20 anni, definito come "esordio giovanile" e fino ai 60 anni, in questo caso si parla di "esordio senile" e gli individui affetti sembrano avere una malattia meno grave rispetto a quelli con esordio nell'età media.

L'inizio della HD è insidioso e graduale, i primi sintomi sono ambigui e possono apparire a livello neurologico sotto forma di movimenti involontari e incoercibili, o a livello psichico come nette alterazioni della personalità (stati depressivi, aggressività). A poco a poco i

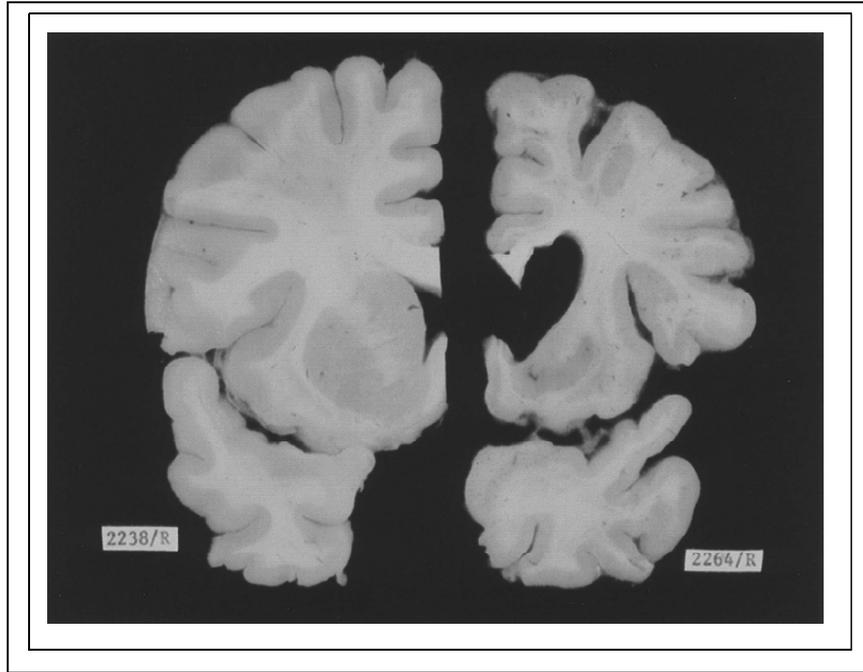
movimenti assumono le sembianze di una danza e l'andatura instabile viene spesso scambiata per uno stato di ebbrezza. Man mano che la malattia progredisce, la corea diventa progressivamente più grave fino a raggiungere un plateau (Folstein et al., 1983). Negli stadi tardivi della malattia, possono diventare più evidenti altri disordini del movimento, come la distonia, bradicinesia e rigidità, che rappresentano caratteristiche importanti dell'HD. I disturbi cognitivi si aggravano progressivamente fino a configurare il quadro di una grave demenza (Bruyn and Went, 1984). Molto frequenti sono i disturbi della personalità, che possono precedere di molti anni la comparsa delle disfunzioni motorie (Speedie et al., 1990). Osservati nel 38% dei pazienti, i disturbi dell'umore non sono distribuiti in modo casuale tra i pazienti, ma sono concentrati in particolari gruppi familiari. La depressione, in questi pazienti, può sfociare in suicidio, che rappresenta non soltanto la comprensibile reazione ad una malattia fatale, ma anche la conseguenza di episodi maniaco-depressivi.

## **1.2 NEUROPATOLOGIA**

### **1.2.1 Anatomia patologica macroscopica**

Il cervello di un paziente affetto da HD si presenta generalmente con un modesto grado di atrofia, specialmente nei lobi frontali, ai bordi della Scissura di Silvio e anche nei lobi occipitali, più evidenti quando la malattia ha avuto una lunga durata. Il peso del cervello è diminuito in media da 150 a 200 gr. I ventricoli sono dilatati in modo evidente, per il marcato rimpicciolimento del nucleo caudato, del centro semiovale, del putamen e del pallido, ciò è chiaramente visibile in sezioni frontali (FIG1). La testa del nucleo caudato, il putamen e il segmento laterale del globus pallidus presentano il grado maggiore di atrofia.

Il corpo calloso è quasi sempre assottigliato e la capsula interna e la commissura anteriore sono più larghe. Le fibre che attraversano il putamen appaiono più spesse ( status fibrosus dello striato).



*Fig.1. Sezione di cervello umano post mortem a livello del caudato-putamen. Sezioni coronali di cervello prese dal caudato-putamen di un individuo normale (sinistra) e uno affetto da corea di Huntington (destra). Il cervello HD sulla destra mostra una degenerazione del nucleo caudato adiacente al ventricolo laterale che si è dilatato in risposta all'atrofia striatale (modified from Alexi et al.,2000).*

### **1.2.2 Anatomia patologica microscopica**

Le alterazioni più significative (necrosi cellulare con marcata astrogliosi) si riscontrano nello striato e nella corteccia cerebrale, soprattutto negli strati III, V e VI (Ross, 1986). La corea di Huntington è caratterizzata da una selettiva perdita neuronale che interessa solo alcune aree encefaliche. La perdita cellulare più marcata si ha a livello dei gangli della base, specialmente nei nuclei caudato e putamen, (MacMillan et al., 1996). Mentre la sintomatologia motoria (corea) è dovuta direttamente alla lesione dello striato, l'alterazione delle funzioni cognitive e l'eventuale demenza sembrano dovute o alla concomitante perdita di neuroni corticali a livello dei circuiti della corteccia prefrontale dorso laterale e della corteccia orbitofrontale laterale, o alla scomparsa della normale attività neuronale a livello di quelle parti dei nuclei della base che sono implicate in funzioni cognitive. La perdita dei neuroni striatali è inizialmente selettiva ed interessa la popolazione dei neuroni GABAergici che proiettano al nucleo esterno del globo pallido.

In condizioni normali, c'è un equilibrio tra le attività di tre sistemi biochimicamente distinti ma funzionalmente interdipendenti: (1) il sistema dopaminergico nigrostriatale; (2) i neuroni colinergici intrastriatali; e (3) il sistema GABAergico che proietta dallo striato al globo pallido ed alla sostanza nera. Quest'ultimo sistema è formato da neuroni efferenti contenenti GABA e sostanza P (SP) o GABA e metencefalina che proiettano al globo pallido interno e alla substantia nigra attraverso una via diretta ed una indiretta. (Albin et al., 1989). Nel circuito che mette in connessione i nuclei della base con il talamo, la via diretta esercita un controllo a feed-back positivo disinibendo il talamo e quindi aumentando l'attività delle proiezioni talamo corticali, mentre la via indiretta esercita un controllo a feed-back negativo inibendo l'attività talamo corticale. Le vie danneggiate nell'HD sono illustrate in FIG 2. Le lesioni del nucleo subtalamico, sia quelle provocate nell'uomo da episodi di ictus cerebrale che quelle indotte sperimentalmente negli animali, determinano la comparsa di movimenti involontari unilaterali degli arti (emiballismo). Anche la caratteristica corea può essere dovuta ad una riduzione dell'attività di controllo dei neuroni del nucleo subtalamico.

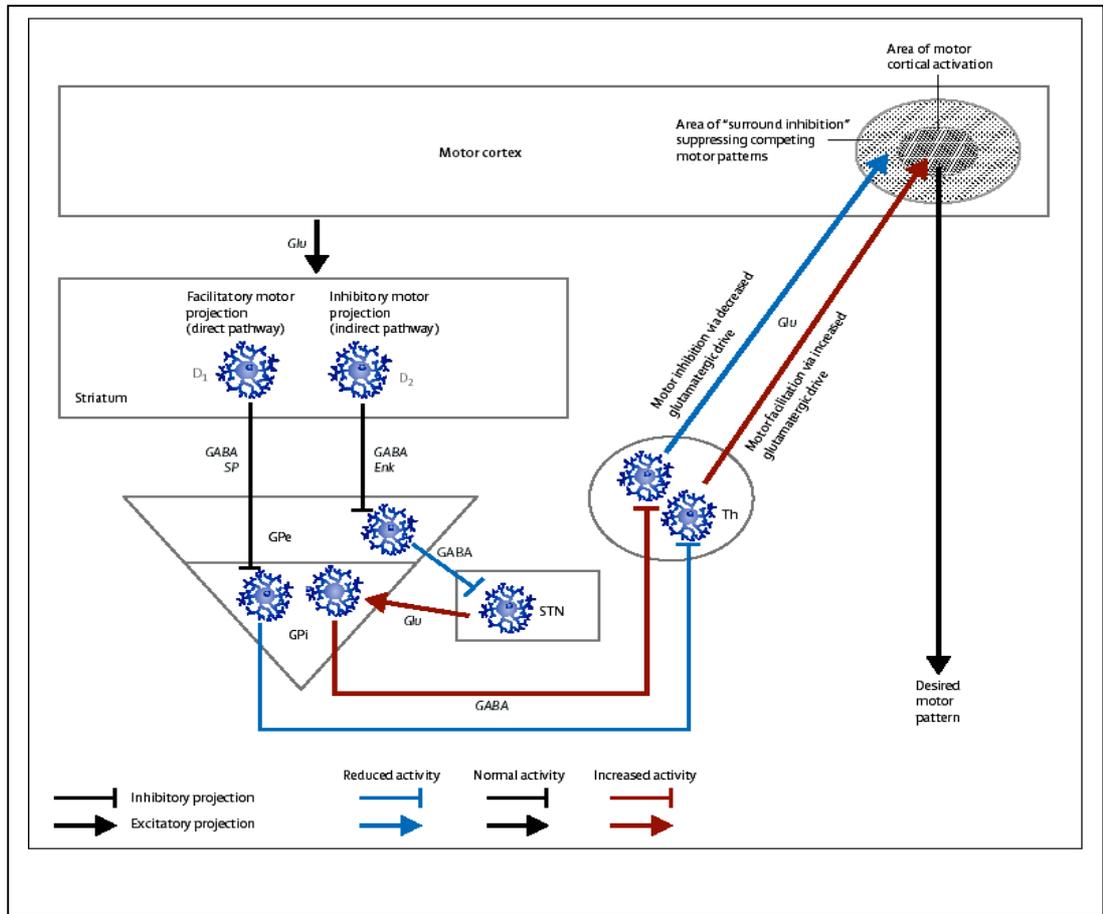


FIG2. Le vie di uscita striatopallidali facilitano (via diretta, linea blu) o inibiscono (via indiretta, linea rossa) l'attività motoria della corteccia.

Nella corea di Huntington i diversi sottotipi neuronali dello striato reagiscono diversamente alla neurodegenerazione. Infatti, mentre i neuroni di proiezione degenerano per primi, gli interneuroni colinergici sono invece molto resistenti (Tab. 1).

Marker	Cell type	Survival in HD
Choline Acetyl Transferase (ChAT)	Cholinergic interneuron	Survive
Somatostatin (SS)	SS/NPY/NOS interneuron	Survive
Parvalbumin (PARV)	PARV interneuron	Majority die
Calretinin (CALR)	Calretinin interneuron	Majority die
Calbindin (CALB)	Matrix projection neuron	Majority die

Tabella 1. Resistenza relativa dei neuroni striatali alla degenerazione da HD (modified from Fusco et al., 1999).

### 1.3 ASPETTI GENETICI

Il gene dell'HD è denominato IT15 da "Interesting transcript 15" e codifica una proteina chiamata huntingtina (Huntington's disease Collaborative research group, 1993; Duyao et al., 1993). Nel primo tratto del gene è localizzata una serie di nucleotidi "CAG", mentre nella popolazione sana il numero di CAG risulta variabile, ma sempre compreso tra 9 e 35 (Snell et al., 1993), i malati di HD presentano ripetizioni di triplette sempre superiori alle 36 unità fino al limite massimo, finora osservato, di 250 (Ashizawa et al., 1994; Gusella et al., 1993). Per ogni tripletta CAG presente nel gene viene incorporato, nella proteina, uno specifico amminoacido, la glutamina(Q). Nei soggetti sani, l'huntingtina avrà dunque un numero di Q entro le 35 unità, mentre nei malati, l'huntingtina mutata (mhtt) avrà un numero di Q molto maggiore, corrispondente alle ripetizioni di CAG presenti nel gene. In base a queste considerazioni, la corea di Huntington viene anche definita malattia da "poliglutamine" o da "triplette".

### 1.4 MECCANISMI MOLECOLARI DELLA NEURODEGENERAZIONE

Il modo in cui l'huntingtina mutata causa la degenerazione neuronale che colpisce i pazienti affetti nella corea di Huntington è stato ed è tuttora oggetto di dibattito. Infatti, sono stati chiamati in causa molteplici fattori. La tendenza attuale è quella di considerare che tutti questi fattori partecipino alla neurodegenerazione. In particolare, le evidenze scientifiche dimostrano diversi elementi che verranno descritti in dettaglio. Le prime osservazioni, durante lo studio della corea, avevano dimostrato che l'huntingtina normale e quella mutata erano equamente distribuite nel cervello dei pazienti con HD, sebbene la regione dello striato fosse quella più gravemente affetta dalla patologia. Questi dati iniziali suggerivano che la malattia non fosse dovuta a una perdita di espressione della proteina normale, ma si andò accreditando l'ipotesi che la malattia fosse dovuta unicamente alla proteina mutata. Tale mutazione avrebbe fatto acquistare alla proteina una funzione tossica (*gain of function*) responsabile della degenerazione dei neuroni striatali. La presunta tossicità viene spiegata

supponendo che la presenza del tratto poliglutammिनico nella proteina ne modifichi la conformazione, e quindi la funzione, provocando interazioni anomale con altre proteine cellulari, modificandone la normale localizzazione o, ancora, rendendola suscettibile al taglio proteolitico. La ricerca ha così centrato i suoi sforzi sulla mutazione per cercare di spiegare i meccanismi alla base di tale tossicità. Un primo risultato ha evidenziato che il tratto polyQ presenta tossicità intrinseca una volta espresso in modelli animali o cellulari. Il passo successivo è stato ottenere modelli animali che producessero l'huntingtina mutata. Il primo modello è stato sviluppato nel 1996 da Gillian Bates, questo modello presentava il primo esone del gene umano codificante per l'htt. Si è così concluso che la tossicità attribuita all'htt mutata dipendesse dalla sequenza poly-Q espansa (Mangiarini et al., 1996). Grazie a questi e altri modelli si è visto anche che l'azione delle caspasi è notevolmente aumentata in presenza della proteina mutata. L'azione delle caspasi porta dunque all'ottenimento di frammenti di huntingtina mutata che possono attraversare la membrana nucleare e dare origine ad inclusioni (NII). La sintesi e la frammentazione dell'huntingtina mutata avvengono nel citoplasma, mentre i suoi frammenti sono traslocati nel nucleo per diffusione passiva (Cooper et al., 1998; Hackam et al., 1998). Ciò è favorito anche dalla grande omologia di sequenza data dall'estremità N-terminale della proteina per le sequenze segnale di localizzazione nucleare (NLS) (Hackam et al., 1998).

Quale sia il loro ruolo e quello della proteina mutata, nell'eziopatogenesi della malattia di Huntington, resta però argomento di acceso dibattito. È stato anche ipotizzato che gli organelli deputati a eliminare le proteine non più necessarie o tossiche, i proteosomi, faticino a degradare la proteina mutata a causa della sua conformazione aberrante. Questo finirebbe con l'esacerbare l'aggregazione dell'htt mutata fino a portare a morte la cellula. La distribuzione degli inclusi nucleari, sia nei neuroni della corteccia, sia dello striato, non è però apparentemente in accordo con la prevalente vulnerabilità di quest'ultimo alla neurodegenerazione della corea di Huntington (Meade et al., 2002; Sun et al., 2002).

E' stata pertanto ipotizzata la presenza di proteine striato-specifiche nei neuroni vulnerabili che interagendo con l'huntingtina mutata vengono intrappolate negli aggregati determinando tossicità cellulare selettiva caratteristica dell'HD (Fusco et al., 1999; Evert et al., 2000). Tra queste molecole si distinguono tre gruppi di proteine: quelle implicate nel *traffico vescicolare*, quelle coinvolte in eventi *trascrizionali*, quelle implicate nella *trasduzione del segnale*, e, infine, la *gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH)* (Burke et al., 1996) e la *cistationina beta sintasi*, le cui interazioni aberranti con l'mhtt provocherebbero anomalie metaboliche ed energetiche.

Per diversi anni l'attenzione è stata focalizzata sull'effetto, la localizzazione e le interazioni dell'htt mutata e l'ipotesi dell'acquisto di funzione escludeva un ruolo dell'htt normale, o della sua perdita, nella malattia. Tuttavia, non si riusciva a spiegare perché questa proteina danneggiasse solo alcune aree del cervello; neanche l'assunzione dell'esistenza di proteine striato-specifiche, appena citate, in grado di interagire con l'htt mutata era in grado di giustificare la tossicità della proteina e la vulnerabilità selettiva dei neuroni striatali osservata nella corea di Huntington. Per questo motivo molti altri studi si concentrarono sull'ipotesi che la malattia potesse dipendere dalla cessazione delle funzioni fisiologiche della proteina normale (*loss of function*).

L'idea è che la proteina normale possa avere funzioni importanti, neuroprotettive, proprio per i neuroni striatali e che la vulnerabilità selettiva di questi neuroni sia da attribuire alla perdita di un effetto benefico dell'htt, a causa della sua mutazione.

L'huntingtina è una proteina che interagisce con numerose altre proteine, può agire da scaffold nell'attivazione e nel corretto assemblaggio di complessi molecolari coinvolti in molti meccanismi cellulari (MacDonald et al., 2003; Marcora et al., 2003). Ha effetti anti-apoptotici nelle cellule eccitabili e noneccitabili. È stato osservato che le cellule che producono più htt normale sono resistenti a vari stimoli di morte, tra cui la privazione di

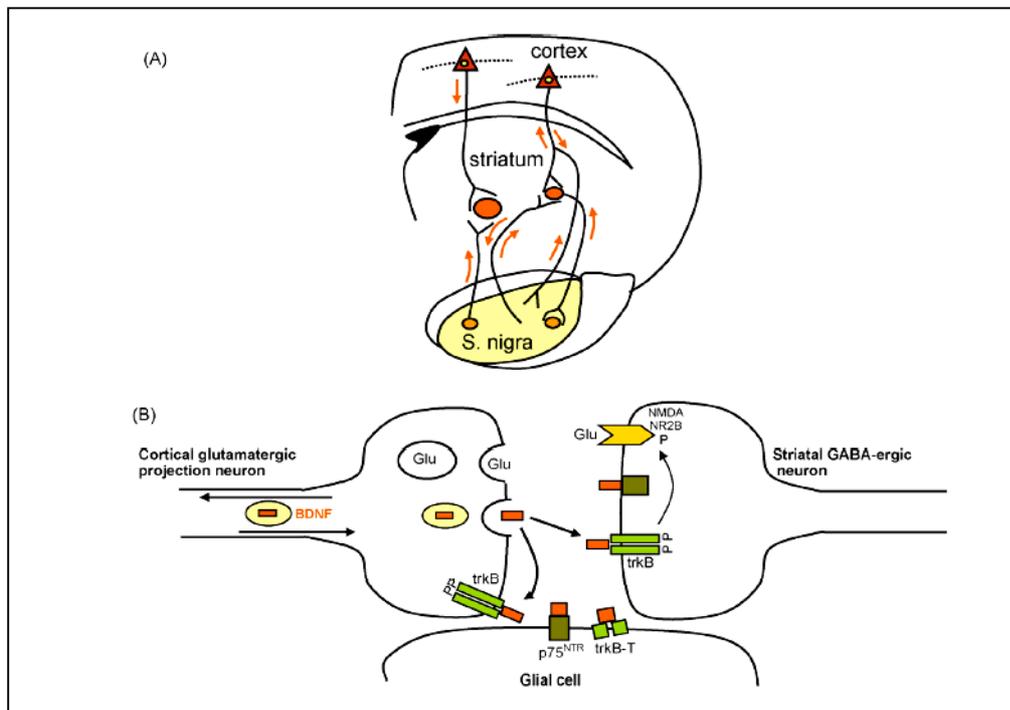
siero, l'aggiunta di tossine mitocondriali, o l'inserzione di geni segnalatori di morte come Bik, Bak o caspasi-9 (Rigamonti et al., 2000).

È stato, anche, dimostrato che l'htt normale esplica questo effetto protettivo in quanto interrompe la normale cascata di eventi molecolari che portano alla morte cellulare per apoptosi.

#### **1.4.1 Huntingtina, BDNF ed Eccitotossicità**

Le neurotrofine svolgono un importante effetto protettivo sui neuroni cerebrali, permettendo lo sviluppo e il mantenimento delle cellule nervose anche in situazioni di stress cellulare.

È noto che il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni striatali, e l'attività delle sinapsi corticostriatali, dipendono in modo specifico dal BDNF, che però non sono in grado di autoprodurlo ma lo ricevono dalla corteccia. Il BDNF infatti viene prodotto nei neuroni corticali e trasportato in senso anterogrado lungo le fibre che si connettono allo striato, dove viene poi rilasciato (Zuccato et al., 2001; Altar et al., 1997 ; Baquet et al., 2004). Un malfunzionamento della connessione cortico-striatale ridurrebbe l'apporto di BDNF rendendoli così più vulnerabili. A livello delle sinapsi cortico-striatali il BDNF può controllare il rilascio di glutammato (Jovanovic, 2000), e una sua somministrazione esogena aumenta la sopravvivenza dei neuroni striatali alla neurodegenerazione indotta da eccitotossine (Bemelmans AP, 1999; Oerez-Navarro, 2005).



*FIG.3 BDNF e sinapsi corticostriatali. (A) Trasporto retrogrado e anterogrado del BDNF tra la corteccia e i gangli della base. (B) Connessioni assodendritiche tra le proiezioni glutammatergiche corticali e i neuroni GABAergici dello striato.*

L'htt normale, oltre all'effetto antiapoptotico, stimola la produzione di BDNF, favorendo la trascrizione del gene per il BDNF a partire dal suo promotore.

Il gene del BDNF ha una struttura complessa, caratterizzata da quattro diverse regioni regolatrici. A monte di ogni gene sono state identificate piccole sequenze promotrici che reagirebbero indipendentemente a stimoli specifici. Da esse si possono originare, quindi, quattro messaggeri diversi, che producono tutti la stessa proteina. L'htt normale induce un aumento del BDNF agendo a livello di uno specifico elemento che comprende il promotore II (Zuccato et al., 2001; Zuccato et al., 2003). Viceversa, la proteina mutata perde questo effetto e riduce anche la sua attività su due degli altri elementi promotori (Zuccato et al., 2001).

Questi risultati sono stati confermati sia in vitro che in modelli animali, dove una iperproduzione di htt normale nella corteccia porta ad un maggior contenuto di BDNF che si riflette in un aumento di questo fattore nello striato (Hodgson et al., 1999). Ciò non si riscontra ne negli animali che producono mhtt ne nei reperti autoptici di corteccia cerebrale di pazienti affetti da HD. Anche cambiamenti nell'omeostasi del calcio possono influenzare

la produzione di BDNF. La trascrizione di quest'ultimo dipende dall'interazione tra il fattore di trascrizione e la regione promotore del BDNF, che include un elemento sensibile al calcio. Altri studi si sono concentrati sul trasporto di BDNF suggerendo che l'htt normale avrebbe un ruolo anche sul trasporto vescicolare del BDNF lungo i microtubuli delle afferenze cortico-striatali e che l'mhtt potrebbe influire sulla capacità del BDNF di raggiungere lo striato (Gauthier et al., 2004). L'htt normale si legherebbe alla proteina associata all'htt (HAP1) e alla subunità p150 della dinactina. A supportare questa ipotesi, ci sono studi che dimostrano come una riduzione dei livelli di htt normale possano portare ad una disfunzione del trasporto assonale della neurotrofina (Gunawardena et al., 2003; Gauthier et al., 2004; Gunawardena et al., 2004).

Nonostante tutto però, perché l'HD sia limitata ai neuroni e in particolare ai neuroni striatali non è del tutto ancora chiaro. Tenendo conto della funzione dell'htt normale nel cervello, una sua ridotta attività su fattori come il BDNF può esasperare la vulnerabilità dei neuroni striatali nei confronti del tratto poligluttamminico espanso. In aggiunta, una ridotta produzione di BDNF può alterare l'attività delle sinapsi cortico-striatali. È stato dimostrato infatti che i MSNs nei topi transgenici sono molto più sensibili alle eccitotossine e che cambiamenti nei livelli di BDNF influenzano i segnali glutammatergici della corteccia (Cepeda C, 2004; Jovanovic, 2000; Zeron, 2002).

Tutti questi dati indicano che l'htt normale ha funzioni neuroprotettive durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale ed è possibile che la carenza di questa proteina in pazienti affetti da HD riduce la capacità dei neuroni a resistere agli insulti tossici della proteina mutata. In modelli animali che presentano la mutazione su entrambi gli alleli il fenotipo è più severo che nei modelli eterozigoti con lo stesso numero di triplette (Reddy PH, 1998; Wheeler VC, 2002). Tutto questo conferma l'ipotesi di una degenerazione dello striato a causa della perdita del ruolo di supporto dell'htt normale. Soprattutto si evidenzia la

possibilità di mettere a punto strategie terapeutiche dirette a ripristinare la funzione dell'htt normale.

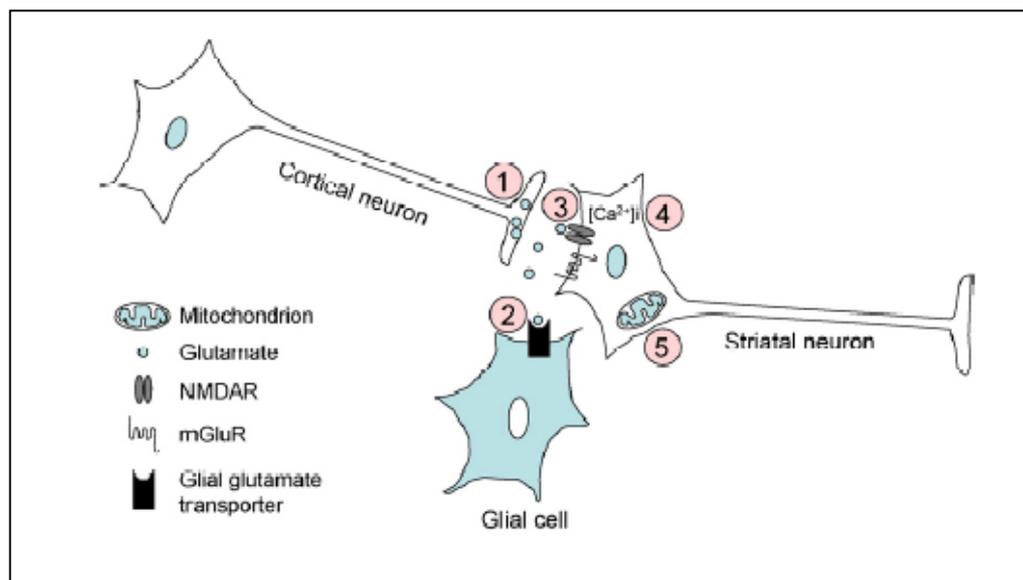
E' stata avanzata l'ipotesi che gli eventi tossici causati dal glutammato, possano contribuire alla patogenesi della corea di Huntington. Nel contesto dell'HD una eccessiva attivazione dei recettori NMDA può dipendere da un aumentato rilascio di glutammato dalle afferenze corticali, da un ridotto uptake del glutammato ad opera delle cellule gliali o da una ipersensibilizzazione degli NMDAR post-sinaptici presenti sui neuroni di proiezione striatale, questi meccanismi insieme ad un'alterata omeostasi del calcio e ad una disfunzione dell'attività mitocondriale porterebbe a neurodegenerazione dei MSNs.(FIG1)

L'eccitotossicità gioca un ruolo importante nella corea di Huntington in quanto scatena una serie di eventi all'interno della cellule quali apoptosi, necrosi e stress ossidativo; è stato osservato che anche la disfunzione mitocondriale è strettamente legata all'eccitotossicità.

E' stato dimostrato che l'iniezione di agonisti NMDA nello striato di ratto determina perdite cellulari simili a quelle che si osservano nell'HD. L'eccitotossicità contribuisce alla morte dei neuroni striatali nell'Huntington (Coyle JT, 1976; McGeer PL, 1978), i quali notoriamente ricevono abbondanti segnali glutamatergici dalla corteccia. Non a caso, i neuroni corticali che proiettano allo striato contengono abbondanti quantità di huntingtina fisiologica, suggerendo in qualche modo che l'huntingtina mutata possa rendere i neuroni corticostriatali più tossici per i loro target striatali (Fusco FR, 1999).

Ad ulteriore prova del coinvolgimento dell'eccitotossicità nella patogenesi della neurodegenerazione nella corea di Huntington, il recettore-agonista del glutammato, l'NMDA (N-Metil-D-aspartato) e l'acido chinolinico producono nell'animale da esperimento cambiamenti Huntington-simili, che includono: gliosi, selettiva morte dei neuroni di proiezione medium spyn (MSNs) contenenti GABA e che proiettano al globo pallido e alla pars reticulata della substantia nigra (Beal MF, 1986), con un relativo

risparmio di neuroni contenenti somatostatina, neuropeptide Y ed acetilcolina (Beal MF B. E., 1993; Young AB, 1988).



*FIG4. La morte neuronale da eccitotossicità deriva dalla combinazione di: (1) aumentato rilascio di Glu dalle afferenze corticali; (2). ridotto uptake di Glu dalla glia; (3). ipersensibilità dei NMDAR e/o aumento del segnale del mGluR; (4). un'alterata omeostasi del calcio; (5). disfunzione mitocondriale.*

Molti studi su modelli di HD supportano l'idea che un'alterata attività dei NMDAR e la disfunzione mitocondriale sono tra loro collegati e che assieme possono aumentare la vulnerabilità dei MSNs all'eccitotossicità. È stato visto che la somministrazione di NMDA in modelli YAC46 o YAC72 porta ad un aumento della depolarizzazione della membrana mitocondriale rispetto al controllo (Zeron MM, 2004).

Il rilascio di *citocromo c*, un indicatore dell'attivazione della cascata apoptotica intrinseca che coinvolge l'apertura del poro mPT, aumenta in colture di MSNs derivati da YAC128 ed esposti a glutammato (Tange t al., 2005). Studi su topi knock-in (STHdh<sup>Q111</sup>) hanno evidenziato una diminuzione della ratio ATP/ADP e della sintesi di cAMP (Gines S, 2003; Seong IS, 2005) ed è stato anche dimostrato che l'attivazione degli NMDAR e l'entrata di calcio favoriscono questi meccanismi, infatti incubando chelatori del calcio quale EGTA o iniettando degli antagonisti degli NMDAR MK-801, si osservava un aumento del rapporto ATP/ADP e di cAMP (Seong et al, 2005).

Una disfunzione del metabolismo energetico abbassa la soglia per la tossicità da glutammato (Novelli A, 1988) e può portare all'attivazione di meccanismi eccitotossici (Beal, 1992) e a stress ossidativo (Coyle, 1993). Sebbene l'HD è il risultato di una mutazione del DNA nucleare e non mitocondriale, è possibile che la forma normale di huntingtina partecipi nella regolazione delle funzioni mitocondriali o che la forma mutata di htt interferisca attivamente con la respirazione cellulare. È stata dimostrata un'associazione dell'htt normale con i mitocondri (Zeron, 2002; Gutekunst CA, 1998; Panov AV, 2002; Choo YS, 2004). Questi dati confermano che in MSNs, che esprimono una htt mutata, la capacità dei mitocondri a soddisfare le richieste energetiche cellulari e a mantenere l'omeostasi intracellulare del calcio è fortemente ridotta, contribuendo in questo modo ad aumentare la suscettibilità al danno eccitotossico e da stress ossidativo. Di conseguenza, l'eccitotossicità, l'attività funzionale dei mitocondri e l'htt mutata sono tra di loro strettamente collegati. Da un lato l'eccitotossicità porta ad un aumento dei livelli di calcio citoplasmatico e dall'altro la presenza di mhtt porta ad una disfunzione dei mitocondri con ulteriore rilascio di calcio dalle sue riserve. In questo modo un'alterata omeostasi del calcio porta ad un rilascio di citocromo C dai mitocondri nel citosol, con conseguente attivazione della cascata apoptotica e morte cellulare

La morte per apoptosi è un processo di "suicidio" delle cellule che avviene a diversi livelli e attraverso diversi elementi. Dopo diversi esperimenti è stato dimostrato il possibile ruolo antiapoptotico dell'huntingtina, la quale agendo a monte nel processo di morte cellulare legato alla "cascata" di reazioni che portano all'attivazione della caspasi 3, previene il proprio processamento. La mancanza di huntingtina normale ha come effetto quello di indurre l'attivazione della caspasi 3, mentre la sovraespressione di huntingtina normale determina l'inibizione della stessa. L'huntingtina sembra interagire fisicamente con la caspasi attiva, ed infatti l'huntingtina mutata si lega con minore affinità ed ha un effetto inibitorio minore sulla caspasi attiva rispetto all' huntingtina normale (Zhang Y, 2006 ). Le

caspasi sono proteasi con cisteina nel sito attivo e vengono attivate in risposta a stimoli apoptotici (reviewed in Nicholson and Thornberry 1997). L'htt presenta diversi siti di taglio per le caspasi (Wellington CL E. L., 2002; Wellington CL S. R., 2000). L'inibizione dell'attività delle caspasi attraverso una forma caspasi-6-resistente di htt mutata, non solo protegge i topi transgenici dall'atrofia striatale e dalla neurodegenerazione, ma riduce in modo significativo il volume di lesione in modelli iniettati con acido quinolinico (Graham RK, 2006). Oltre alla capacità di creare dei frammenti di htt, le caspasi hanno un ruolo molto importante nell'apoptosi indotta da attivazione dei recettori NMDA e la loro attività è modulata dalla lunghezza della polyQ dell'htt mutata. In modelli animali la caspasi 3 attivata aumentava drasticamente dopo l'esposizione ad NMDA (Zeron et al., 2002), mentre l'inibizione della caspasi 3 proteggeva i MSNs da morte cellulare indotta da attivazione degli NMDAR.

Sembra quindi che la neurodegenerazione nell'HD non segua il classico processo di apoptosi. Studi ultrastrutturali e dell'espressione genica di cervelli di topi transgenici R6/1 portatori della malattia, sembrano escludere questo processo di morte cellulare: i neuroni in degenerazione mostrano condensazione nucleare e citoplasmatica ma non sono mai state riscontrate caratteristiche tipiche dell'apoptosi (come la presenza di corpi apoptotici); le alterazioni nell'espressione genica, inoltre, non sembrano compatibili con un processo apoptotico in atto, suggerendo una sorta di conflitto tra eventi pro e anti-apoptotici (Iannicola C et al., 2000). È stato detto precedentemente che l'apoptosi può essere indotta anche da danneggiamento dell'attività mitocondriale che consegue all'inibizione dei complessi della catena respiratoria. (Seaton TA et al., 1997; Zamzami, 1997). La disfunzione mitocondriale porta alla liberazione di citocromo c e di fattori proapoptotici (AIF) (Susin SA et al., 1996; Thornberry NA et al., 1998). Cervelli affetti da HD, marcati mediante TUNEL, mostravano un'intensa morte per apoptosi ed un'aumentata attività della caspasi-8 (Dragunow M et al., 1995; Sánchez I et al., 1999). Altri studi, invece, hanno

evidenziato che c'è una correlazione fra il numero delle triplette CAG e il grado della frammentazione nucleare nello striato affetto da HD (Zeron et al., 2002). Questa ipotesi è stata confermata da ricerche condotte da Shehadeh e colleghi (Shehadeh et al., 2006) che dimostrarono come la tossicità NMDAR-dipendente fosse più pronunciata rispettivamente nei modelli YAC128, YAC72, YAC18, e che tale relazione è più evidente nella tossicità mediata dai recettori NMDA che non dai recettori AMPA (Tang TS et al., 2005). Infatti l'uso di antagonisti dei recettori NMDA, tipo AP-5, in modelli YAC72 per ridurre l'entrata di calcio riportandoli a livelli basali, risultava anche in una riduzione dell'apoptosi indotta da NMDA (Shehadeh et al., 2006).

## **2. FUNZIONE E REGOLAZIONE DEI FATTORI TRASCRIZIONALI DELLA CREB NEL SISTEMA NERVOSO**

Il controllo dell'espressione genica, attraverso numerosi fattori di trascrizione nucleare, è un meccanismo di fondamentale importanza in diverse funzioni cellulari, quali crescita e differenziazione, apoptosi e morte cellulare; meccanismi di sviluppo, omeostasi e adattamento alle variazioni dell'ambiente extracellulare. Diverse molecole segnali, quali neurotrasmettitori, fattori di crescita (NGF, BDNF) e alcuni farmaci, possono modificare l'attività e l'espressione di molti fattori di trascrizione attivando, per esempio, sistemi di secondi messaggeri (cAMP e PKA) che portano alla fosforilazione ed attivazione della CREB (Nestler EJ et al., 2001).

### **2.1 CARATTERISTICHE STRUTTURALI DELLA CREB**

Il fattore di trascrizione CREB (cAMP response element-binding protein) appartiene alla famiglia di proteine con leucine/zipper; in seguito a fosforilazione sul residuo Ser-133, la CREB diventa attiva e si lega sulla sequenza di DNA denominata CRE (Cyclic AMP responsive element), che precede il gene che deve essere trascritto.

All'interno di questa superfamiglia, questa proteina e i fattori ad essa associati CREM (cAMP response element modulator) e ATF1 (activating transcription factor 1) comprendono una subcategoria definita come famiglia CREB. Come tutti i fattori di trascrizione bZIP, i membri della famiglia CREB contengono un dominio C-terminale di base che media l'avvolgimento del DNA, e un dominio cerniera di leucina che facilita la dimerizzazione. La CREB, CREM e ATF-1 sono molto simili tra loro, specialmente nel dominio bZIP, coerentemente con il fatto che questi fattori possono formare contemporaneamente omo e eterodimeri, e che ciascuna proteina può avvolgersi allo stesso elemento cis-regolatorio. Il segmento, cAMP response element (CRE) consiste di una sequenza consenso palindromica TGACGTCA. Infatti, molti siti che legano la CREB comprendono delle variazioni di questa sequenza consenso, quasi tutti contenenti però una sequenza consenso CGTCA. Mentre il dominio bZIP media l'avvolgimento e la dimerizzazione del DNA, i restanti domini della famiglia CREB sono necessari per facilitare l'interazione di coattivatori e componenti del meccanismo di trascrizione che permettono la sintesi dell'RNA. I domini funzionali della CREB sono schematizzati nella fig.5

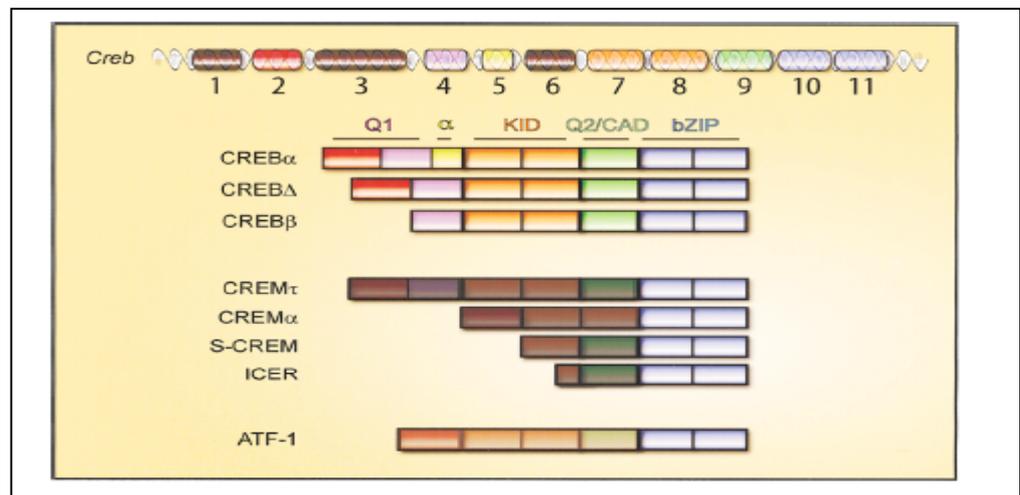


Fig. 5. Organizzazione del gene e struttura del dominio dei fattori della famiglia di trascrizione della CREB (Lonze BE, 2002).

Interessante è il fatto che i fattori CREB e CREM possono funzionare sia come attivatori che repressori trascrizionali. Le isoforme CREB più abbondanti, CREB $\alpha$  e CREB $\Delta$ , contengono il dominio bZIP e due domini ricchi di glutamina, chiamati Q1 e Q2/CAD (constitutive active domain) separati dal KID (kinase active domain). Questi due attivatori differiscono solamente per la presenza o assenza di un dominio  $\alpha$ . All'interno dei residui KID, un ruolo particolarmente importante è svolto dal residuo Ser-133 che, grazie ad uno stimolo indotto viene fosforilato trasformando così il dominio KID in un target per il coattivatore trascrizionale CBP (CREB binding protein) (Kwok, 1994) si lega, con il proprio dominio KIX al dominio KID del residuo Ser-133 fosforilato (Parker D, 1996; Radhakrishnan I, 1997) e questa interazione stimolo-dipendente funziona da innesco per l'espressione genica. Q2/CAD interagiscono con i componenti del complesso di trascrizione facilitando l'espressione genica CRE-regolata stimolo-indipendente (Ferrerri K, 1994; Quinn N, 1998; Xing L, 1995).

## 2.2 CREB E I GENI BERSAGLIO

La lista dei geni target della CREB comprende geni che controllano la neurotrasmissione, la struttura cellulare, la trasduzione del segnale, la trascrizione, e il metabolismo (reviewed in Mayr e Montminy, 2001).

- **Neurotransmission/Pep tides**
- Acetylcholinesterase (AChE),  $\alpha$ -1-GABA<sub>A</sub> receptor,  $\alpha$ -1-adrenergic receptor,  $\alpha$ -2-adrenergic receptor, Cardiotrophin-1 (CT-1), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Cholecystokinin (CCK), Chromogranin A, Chromogranin B, Corticotropin-releasing hormone, Dopamine  $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H), Enkephalin, Galanin, Galanin receptor1 (GalR1), Glycoprotein hormone  $\alpha$  subunit, Gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR), Human chorionic gonadotropin- $\alpha$  (hCG- $\alpha$ ), Murine gastrin-releasing peptide receptor
- (mGRP-R), Ne urotensin/neuromedin N (NT/N), Norepinephrine transporter (NET), Pituitaryadenyl cyclase activating polypeptide
- (PACAP), Pre protachykinin A, Prodynorphin, Proenkephalin, Proglucagon, Secretogranin, Secretogranin II, Somatostatin, Somatostatin
- receptor (ssr-2), Substance P receptor, Synapsin I, Tyrosine aminotransferase, Vasoactive intestinal polypeptide (VIP), Vasopressin
- (AVP), Vesicular monoamine transporter (VMAT), VGF
- **Growth Factors/Hormones**
- Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Fibroblast growth factor-6 (FGF-6), Flt-1, Insulin-like growth factor I (IGF-I), Inhibin  $\alpha$
- Leptin, Transforming growth factor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2), TrkB
- **Structural**
- E-cadherin, Fibronectin, ICAM-1, Neurofilament 68 kDa (NF-L)
- Channels/Transporters
- Aquaporin-2 (AQP-2), Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), Glucose transporter 2 (GLUT2), Kv3.1 K $^{+}$  channel, Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase  $\alpha$
- **Cellular Metabolism**
- Arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT), Bcl-2, Cyclooxygenase-2 (COX-2), Cytochrome c, Glutamine synthetase (GS), Heme oxygenase-1 (HO-1), Hexokinase 2, HMG-CoA synthase, Neuron specific enolase (NSE), Ornithine decarboxylase,
- Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), Pyruvate carboxylase, Superoxide dismutase 2 (SOD2), Ubiquitin-conjugating enzyme, Uncoupling protein-1 (UCP1), Uncoupling protein-2 (UCP2), Uncoupling protein-3 (UCP3)
- **Transcription**
- Activating transcription factor-3 (ATF-3), C/EBP- $\beta$ , c-fos, CREB, Egr-1, ICER, JunD, Krox-20, mPer1, mPer2, Nurrl, Pit-1, STAT3
- Signal Transduction
- 14-3-3- $\gamma$ , Cyclin A, Cyclin D1, Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Neurofibromatosis 1 (NF-1), Neuronal nitric oxide synthase
- (nNOS), Prostaglandin synthase-2 (PGS2), Serum and glucocorticoid inducible kinase
- 

## 2.3 SEGNALI E REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA CREB

I meccanismi molecolari con cui la CREB attua le proprie funzioni sono stati oggetto di molti studi. Molti sono gli stimoli extracellulari che inducono attivazione della CREB.

All'interno del dominio KID, il residuo Ser-133 è stato identificato come sito regolatore chiave la cui fosforilazione è necessaria perché la CREB passi da una forma inattiva alla forma attiva. La fosforilazione della CREB è indotta da una serie di stimoli extracellulari, quali fattori di crescita, depolarizzazione e attività sinaptica durante il normale funzionamento neuronale, ipossia e stimoli ischemici o danni neuronali fig. 5

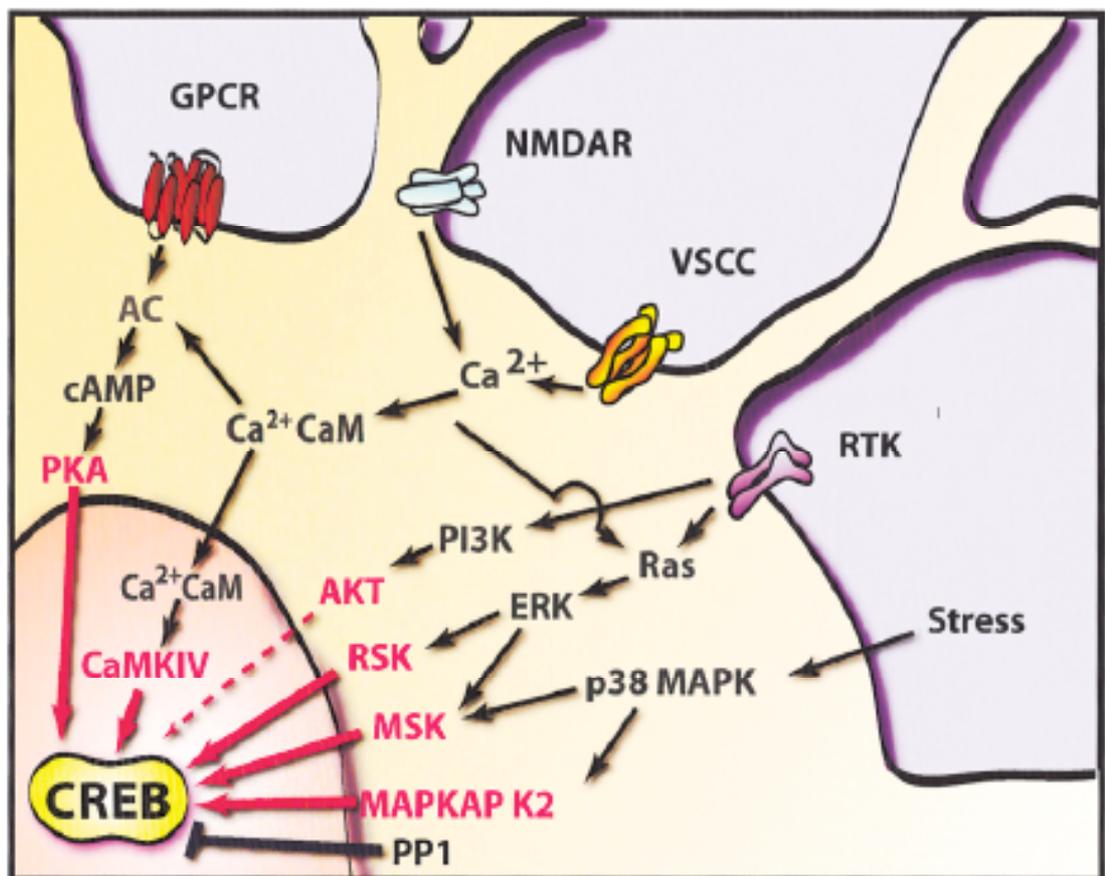


FIG 6. Vie di attivazione della CREB

## 2.4 MECCANISMI CHE CONDUCONO ALLA FOSFORILAZIONE DELLA CREB

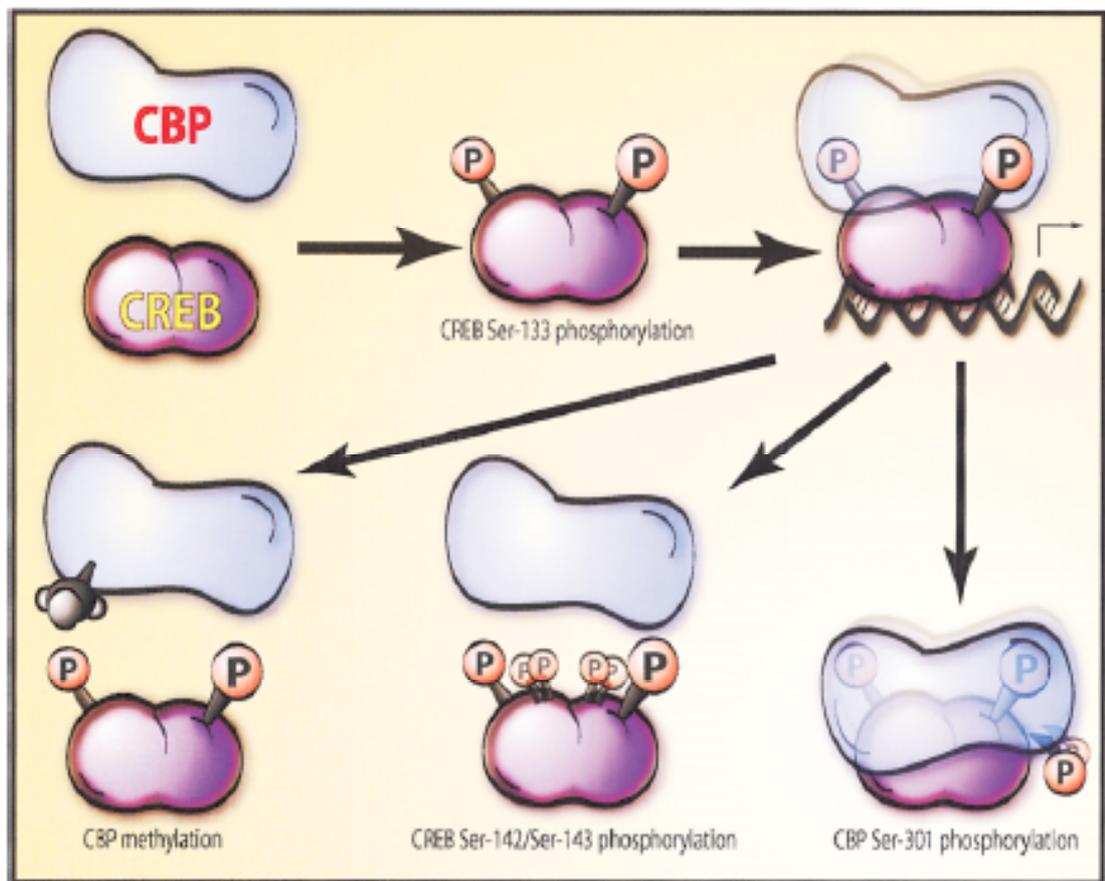
Uno studio condotto da Goodman, e colleghi sui meccanismi della cAMP come fattore che induce la trascrizione della somatostatina ha determinato la scoperta del cAMP response element (CRE) e dei suoi promotori (Montminy MR, 1990). Questo ha rappresentato un passo avanti per la conoscenza dell'espressione genica stimolo-indotta ed una guida per la clonazione della CREB (Gonzalez GA, 1989; Hoeffler JP, 1988). Successivamente, la

correlazione tra il cAMP e l'espressione genica CREB-dipendente è stata identificata grazie al fatto che la fosforilazione della CREB Ser-133 rappresenta l'evento centrale dell'attivazione della CREB (Gonzalez GA Y. K., 1989). La chinasi responsabile di questa attivazione della fosforilazione è la PKA, una protein chinasi cAMP dipendente (Gonzalez e Montminy, 1989). L'attività della PKA è regolata da molecole che modificano i livelli di cAMP, e quindi da molecole che regolano l'attività dell'adenilato ciclasi, la G-proteina più conosciuta associata a recettore (GPCRs). Nel sistema nervoso, la GPCRs ha la funzione di recettore- ligando funzionalmente molto importanti, inclusi molti neurotrasmettitori. Grazie a questi recettori, i neurotrasmettitori e i neuropeptidi possono associarsi al cAMP, PKA e, infine, alla CREB. La capacità di attivare la CREB attraverso la PKA, comunque, non si riduce all'attivazione del ligando del GPCRs perché anche alcuni tipi di adenilato ciclasi sono regolati da  $Ca^{2+}$ . Infatti l'attivazione della CREB attraverso la PKA può anche avvenire in risposta ai molti stimoli capaci di incrementare il  $Ca^{2+}$  intracellulare (Poser S, 2001). Per quel che riguarda il segnale del  $Ca^{2+}$  nei confronti della CREB, studi di Greenberg hanno dimostrato che molti neurotrasmettitori sono capaci di attivare l'espressione dei geni immediate attraverso un meccanismo  $Ca^{2+}$  dipendente (Morgan JI C. T., 1986; Morgan JI C. D., 1987; Sheng M, 1990). Studi successivi hanno dimostrato che la CREB può funzionare come un fattore di trascrizione inducibile dal  $Ca^{2+}$  (Dash PK, 1991; Sheng M T. M., 1991; Shaywitz AJ, 1999). Nei neuroni, l'incremento di  $Ca^{2+}$  è dato principalmente attraverso canali cationici ligando o voltaggio dipendente. Per quanto concerne la depolarizzazione delle membrane, per esempio, l'afflusso del calcio avviene attraverso dei canali cationici voltaggio dipendenti (VSCC), come il canale  $Ca^{2+}$  di tipo L. Invece, durante la trasmissione glutammatergica sinaptica, il glutammato, ad esempio, si lega a recettori ionotropici, come il sottotipo NMDA, che dopo essere stati attivati possono funzionare come canali cationici permeabili agli ioni. Gli ioni  $Ca^{2+}$  interagiscono con molte molecole intracellulari, tra cui la più conosciuta è la  $Ca^{2+}$  binding protein calmodulina (CaM). A prescindere dalla sua

locazione, il complesso  $Ca^{2+}$ -CaM può attivare CaMKI, CaMKII, e CaMKIV, ognuno dei quali ha la capacità di fosforilare la CREB, almeno *in vitro* (West AE, 2001)(Dash et al., 1991; Sheng et al., 1991; West et al., 2001). Tra queste, la CaMKIV risulta la più importante tra le chinasi della CREB attivate dallo ione  $Ca^{2+}$  (Anderson KA, 2002; Ho, 2000; Kang H, 2001; Ribar TJ, 2000; Wei F, 2002). Oltre alla capacità di attivare le CaMKs, il  $Ca^{2+}$  sembra attivare anche un'altra via, e cioè il ciclo della Ras/ERK (Davis S, 2000; Dolmetsch RE, 2001; Roberson ED, 1999; JD, 2001) che attiva un gruppo indipendente di chinasi della CREB.

## **2.5 TRASCRIZIONE GENICA CREB-MEDIATA.**

In assenza di stimolazione, la CREB, attraverso il CAD, che è il suo dominio di attivazione costitutivo, assembla il macchinario per la trascrizione basale (fig.7). Al momento della stimolazione e fosforilazione della Ser-133 della CREB, la CBP è reclutata dalla CREB, così come la sequenza CRE nel promotore. Il reclutamento di questo coattivatore serve almeno per due importanti funzioni. Primo, la CBP ha la capacità di legare i componenti base della trascrizione, ed inoltre si pensa che stabilizzi il complesso pre-inizio che si forma al promotore (Kwok RP, Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB., 1994)(Kwok et al., 1994; Nakajima et al., 1997; Swope et al., 1996). Secondo, CBP, attraverso l'attività endogena HAT (Bannister e Kouzarides, 1996), acetila istoni per facilitare il non arrotolamento della cromatina e, a turno, incrementa l'accessibilità alla cromatina locale da parte del complesso trascrizionale. Attraverso queste due funzioni, si ritiene che la CBP incrementi l'attività trascrizionale del complesso nucleare della CREB e di conseguenza incrementi l'attività del promotore del CRE attraverso un meccanismo stimolo-dipendente.



*Fig.7. La fosforilazione della Ser-133 della CREB e modificazioni aggiuntive sia della CREB che della CBP controllano la trascrizione genica CREB dipendente (da Lonze e Ginty, 2002).*

## 2.6 I FATTORI DI CRESCITA E LA CREB

Gli esempi precedenti illustrano i modi in cui un singolo stimolo, come il glutammato, può attivare più di una chinasi della CREB attivando vie di segnale parallele. Come il glutammato, i fattori di crescita neuronali sembrano capaci di scatenare vie parallele dirette dalla fosforilazione della CREB attraverso l'attivazione di un singolo recettore (Bonni et al., 1995; Finkbeiner et al., 1997; Ginty et al., 1994). Molti fattori di crescita, incluse le neurotrofine, ed in particolar modo il BDNF, comunicano attraverso un recettore tirosina chinasi che, è in grado di attivare diverse cascate di segnali (Patapoutian A, 2001; Sofroniew MV, 2001).

## 2.7 CREB, cAMP E FOSFODIESTERASI TIPO IV

Com'è stato detto sopra, la fosforilazione della CREB Ser-133 rappresenta l'evento centrale dell'attivazione della CREB (Gonzalez e Montminy, 1989). La chinasi responsabile di questa attivazione della fosforilazione è la PKA, una protein chinasi cAMP dipendente (Gonzalez e Montminy, 1989). La sintesi e la degradazione dei nucleotidi ciclici, quali cAMP e cGMP, sono dei meccanismi altamente controllati. Questi processi coinvolgono una regolazione a feedback, una modulazione attraverso dei secondi messaggeri ed una compartimentalizzazione intracellulare. Il cAMP è sintetizzato da una adenil-ciclastasi: l'attivazione di questa ciclastasi, dopo stimolazione di un recettore specifico di membrana, o dopo aumento della concentrazione del calcio intracellulare, risulta in un accumulo del nucleotide ciclico in microdomini cellulari. Da questi microcompartimenti il segnale extracellulare viene trasferito dal cAMP a proteine effettrici; la più importante è la PKA. Una volta attivata la PKA porta alla fosforilazione di enzimi o fattori di trascrizione, come la CREB, che a loro volta attivano una cascata di eventi cellulari che rappresentano la risposta agli stimoli esterni. La famiglia delle fosfodiesterasi (PDEs) ha un ruolo chiave nella regolazione temporale e spaziale di questi microdomini (Houslay MD, 2003; Baillie GS, 2005 ). La PDE4 è la principale famiglia delle fosfodiesterasi coinvolte nella degradazione ed inattivazione dell'cAMP che porta, quindi, ad un'interruzione della trasmissione del segnale intracellulare (Houslay MD, 2003). Diversi studi hanno dimostrato che l'inibizione delle PDE4 hanno effetti terapeutici in molte patologie neurodegenerative (Houslay MD S. P., 2005 ). Uno degli inibitori più studiati è il rolipram. L'inibizione della PDE4 porta ad un aumento dell'cAMP, un aumento dell'attivazione delle PKA e fosforilazione della CREB (Rose GM, 2005). È stato dimostrato che il rolipram, attivando la via cAMP/CREB, facilita l'induzione della memoria a lungo termine nell'ippocampo (Barad M, 1998; Monti B, 2006). È stato anche osservato che gli inibitori della PDE4 hanno effetti sugli stati depressivi (O'Donnell JM, 2004), in questo caso l'inibizione della PDE4 porta ad una iperespressione

del BDNF (Monnet FP, 2005) e ad una stimolazione della neurogenesi nell'ippocampo. Anche in questo caso l'aumento della produzione del BDNF può essere ricondotto ad un aumento dell'cAMP, della pCREB e sintesi del gene per il BDNF.

## **2.8 FUNZIONI GENERALI DELLA CREB**

Negli organismi multicellulari, la capacità di una cellula di comunicare con l'ambiente che la circonda è fondamentale per assicurare che la funzione della cellula sia appropriata all'interno dell'organismo stesso. E' ben noto che i segnali extracellulari sono capaci di promuovere drastici cambiamenti e di esercitare effetti durevoli quali la crescita, la sopravvivenza, la morte, la proliferazione e differenziazione delle cellule.

Questi e altri processi cellulari sono per la maggior parte diretti da stimoli che inducono cambiamenti nell'espressione genica. Questi stimoli esercitano i loro effetti attivando la cascata dei segnali che dirigono l'azione di fattori nucleari che a loro volta promuovono la trascrizione all'interno del nucleo. Recentemente sono stati identificati numerosi fattori di trascrizione implicati nel funzionamento di questi processi ed è stato dimostrato che la maggior parte delle funzioni fisiologiche sono controllate da neurotrasmettitori che agiscono attivando sistemi di secondi messaggeri (cAMP e PKA) che fosforilano la CREB (Nestler EJ 2001). La CREB è attivata in risposta a vari stimoli fisiologici. La conseguenza immediata di tale attivazione è l'inizio di una nuova trascrizione genica e l'attivazione di una serie di risposte cellulari (fig. 8).

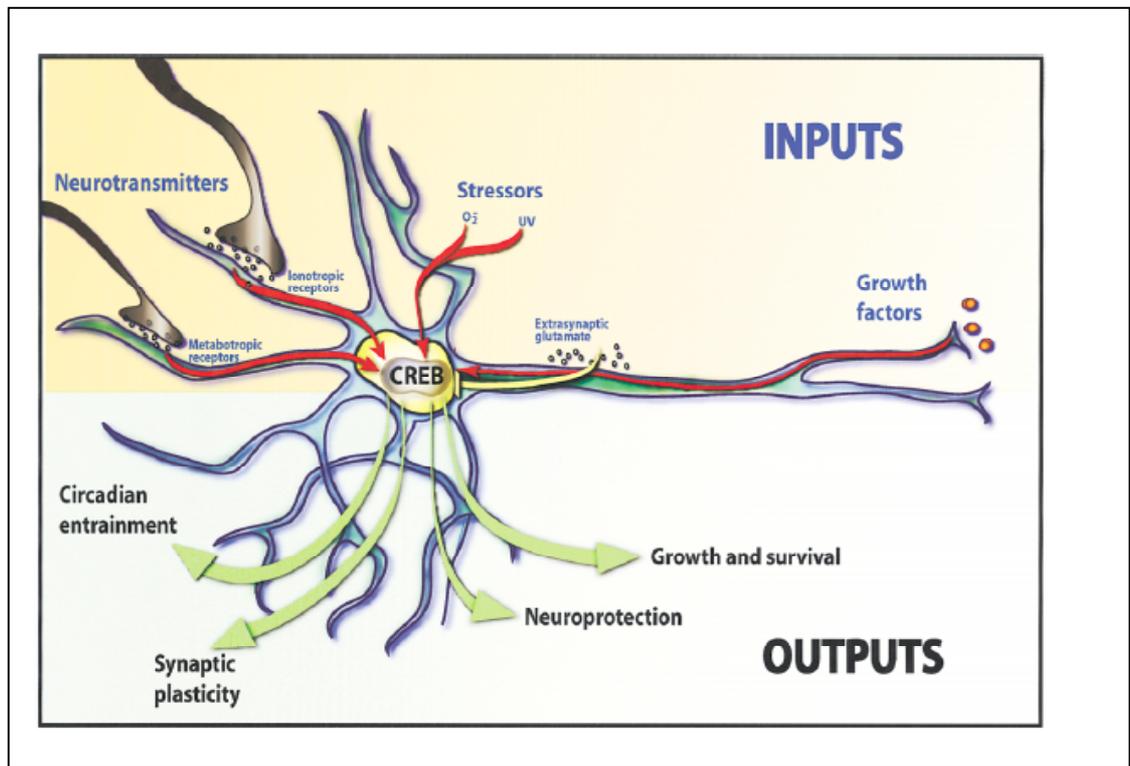


Fig. 8. L'espressione genica CREB dipendente è critica per varie funzioni dello sviluppo del sistema nervoso centrale (da Lonze e Ginty, 2002 ).

La CREB è coinvolta nei processi di apprendimento, memoria e plasticità sinaptica. Infatti, lo sviluppo di nuove connessioni sinaptiche nei meccanismi di potenziamento a lungo termine richiede proteine di nuova sintesi e attivazione della trascrizione di geni CREB-mediata (Kandel 2001). La CREB potrebbe avere un ruolo chiave come fattore di neuroprotezione (Riccio A, 1999). L'importanza di questo fattore di trascrizione nella sopravvivenza neuronale è stata confermata da studi con topi transgenici, in cui l'ablazione del gene che codifica per la CREB e del suo fattore modulatore CREM, porta ad una progressiva e profonda neurodegenerazione del sistema nervoso centrale (Mantamadiotis, 2002). È stato anche osservato che l'espressione di bcl-2, uno dei fattori anti-apoptotici che viene attivato da un meccanismo CREB- mediato, è maggiore nella fase post-ischemica (Tanaka Y, 2000). Un'alterata attività della CREB è stata osservata anche in situazioni di stress ossidativi in risposta a condizioni di ischemia cerebrale (Tanaka K, et al, 2000), in condizioni di eccitotossicità da glutammato e in molte malattie neurodegenerative (il morbo d'Alzheimer, la corea di Huntington). Ciò suggerisce che l'attivazione di un programma di

sopravvivenza CREB-dipendente può rappresentare una forma di difesa della cellula in seguito a stimoli nocivi (Mabuchi T, 2001).

### **2.8.1 CREB e Sviluppo del Sistema Nervoso**

All'interno del sistema nervoso, i fattori di crescita insieme ad altri stimoli regolano un vasto range di processi, inclusa la proliferazione dei precursori neuronali e la crescita, sopravvivenza, e connettività sinaptica dei neuroni in crescita. Molti, ma non tutti, gli stimoli che contribuiscono a questi processi hanno anche la capacità di influenzare l'espressione genica nucleare. Partendo dall'osservazione che la fosforilazione della CREB e l'espressione genica CRE-mediated si attivano in risposta a mitogeni, neurotrofine e altri fattori di crescita neuronali, sono state condotte delle ricerche sui possibili contributi di questi fattori specifici negli eventi chiave dello sviluppo del sistema nervoso. Studi *in vitro* nei quali i membri della famiglia della CREB sono stati inibiti hanno suggerito che l'espressione genica CREB-mediated è necessaria e sufficiente per la sopravvivenza di vari tipi di neuroni. (Riccio A, 1999; Walton M, 1999). Ulteriori ricerche che utilizzavano topi transgenici per la CREB (Rudolph D, 1998) hanno rafforzato questi risultati ed hanno dimostrato che la CREB è necessaria per permettere la sopravvivenza dei neuroni sensoriali DRG *in vivo* e dei neuroni simpatici *in vitro* (Lonze BE, 2002). La CREB attiva la trascrizione di alcuni fattori che permettono la sopravvivenza cellulare, come bcl-2 (Riccio et al., 1999).

### **2.8.2 La CREB nell'Apprendimento, nella Memoria e nella Plasticità Sinaptica**

I primi studi comportamentali sull'apprendimento e memoria a lungo termine hanno rivelato la necessità della CREB per la sintesi di nuove proteine, per la trascrizione genica, e per cambiamenti a lungo termine della plasticità sinaptica (Silva AJ, 1998)(Kandel, 2001). Infatti, la fosforilazione della CREB e l'espressione genica della CRE è stata osservata nei neuroni corticali durante lo sviluppo della plasticità (Pham TA, 1999), nei neuroni

ippocampali in risposta agli stimoli indotti dalla long term potentiation (LTP) e durante i processi di formazione della memoria (Davis S, 2000; Stanciu M, 2001; Taubenfeld SM, 2001). I primi topi utilizzati per studi comportamentali presentavano una mutazione ipomorfica nel gene della CREB (Hummler et al., 1994). I primi studi fatti utilizzando questi topi mostrano la presenza di difetti nella memoria spaziale, e nell'LTP ippocampale, suggerendo che la CREB è necessaria per la memoria a lungo termine (Bourtchuladze et al., 1994).

### **2.8.3 CREB nella Neuroprotezione e nella Malattia**

La CREB è attivata non solo in risposta a stimoli che favoriscono la crescita e la sopravvivenza cellulare, ma anche in risposta a stimoli di stress (Deak et al., 1998; Iordanov et al., 1997; Tane et al., 1996; Wiggin et al., 2002). Nei neuroni infatti, la CREB è fosforilata in condizioni di ipossia e di stress ossidativi, suggerendo che l'attivazione dei sistemi di sopravvivenza CREB-dipendenti in risposta a stimoli nocivi rappresenta una forma cellulare di difesa, suggerendo dunque che la CREB ha un ruolo neuroprotettivo.

Nei modelli animali, gli insulti ischemici sono capaci sia di fosforilare la CREB, (Hu et al., 1999; Mabuchi et al., 2001; Tanaka et al., 2000; Walton et al., 1999) sia di indurre l'espressione genica CRE-mediated (Mabuchi et al., 2001) nei neuroni. L'importanza funzionale dell'attivazione della CREB in risposta allo stress è sottolineata dall'osservazione che, in alcuni tipi di cellule, la differente suscettibilità alla morte cellulare dovuta all'ipossia si adatta con la capacità di permettere la fosforilazione della CREB. Nell'ippocampo, un'ischemia temporanea produce una fosforilazione della CREB nei neuroni CA1, che risulta invece prolungata nei neuroni del giro dentato. Mentre i neuroni CA1 degenerano fortemente in seguito ad insulto ischemico, i neuroni del giro dentato sono sostanzialmente conservati, quindi ci sono ragioni per credere che la neuroprotezione nel giro dentato sia dovuta all'attivazione di processi CREB-dipendenti. Questa neuroprotezione sembra richiedere l'espressione genica CREB-dipendente. Inoltre, nelle cellule PC12, l'ipossia induce

l'espressione di bcl-2, un gene CREB-dipendente il cui prodotto è un fattore che stimola la sopravvivenza cellulare (Freeland K et al., 2001) e nei neuroni in cultura bcl-2 risulta sovraespresso nelle cellule che resistono agli stimoli dannosi (Mabuchi et al., 2001). Queste osservazioni suggeriscono un modello dove gli insulti sono capaci di scatenare due segnali paralleli, uno che codifica la natura della lesione e un secondo, che essendo deficitario, attiva un meccanismo diretto dalla CREB che stimola la sopravvivenza cellulare; così il destino di una cellula può essere determinato dalle forze relative di questi due segnali.

Dato che la CREB ha un ruolo centrale non solo nella sopravvivenza cellulare ma anche in molti altri processi fisiologici, non ci si stupisce del fatto che interrompendo il funzionamento della CREB si abbiano delle conseguenze molto gravi. Partendo dall'osservazione che il mancato funzionamento della CREB nei topi è letale (Rudolph et al., 1998) si ritiene che la sua mancanza non sia compatibile con la vita. Sono descritte anche alcune condizioni, dovute a disordini genetici, dove proteine che interagiscono con la CREB sono difettive. In molti casi, il meccanismo con cui l'interruzione della funzione della CREB può dare malattia è poco conosciuto. Fanno eccezione un gruppo di malattie caratterizzate da ampliamento della ripetizione di poliglutamine, tra le quali è inclusa la corea di Huntington. Recentemente è stato osservato che i cofattori della CREB, CBP, P/CAF e TAF<sub>II</sub>130 hanno un ruolo centrale nella fisiopatologia della corea di Huntington (reviewed in Dawson e Ginty, 2002). Più nello specifico, alcuni gruppi indipendentemente l'uno dall'altro, hanno osservato che la proteina huntingtina mutata per mezzo di tratti espansi di poliglutamina, forma aggregati nucleari che contengono CBP (McCampbell A et al., 2000; Nucifora FC et al., 2001; Steffan et al., 2001). Questa mancanza di CBP compromette presumibilmente la trascrizione dei geni CBP, e può direttamente contribuire alla morte neuronale associata con HD. Tra le più importanti prove in supporto a questa idea abbiamo la scoperta che la morte cellulare, in seguito all'espressione di huntingtina mutata può essere parzialmente bloccata dalla sovraespressione di CBP (Nucifora et al., 2001). Così l'abilità della CBP di interagire

con i suoi vari fattori di trascrizione, inclusa la CREB, sembra essere richiesta per la sopravvivenza neuronale in alcune condizioni. Inoltre, gli effetti della CBP che determinano sopravvivenza possono dipendere anche dalla sua attività di acetiltrasferasi istonica (HAT), con cui probabilmente modifica la cromatina locale e permette alla macchina trascrizionale di base di accedere al promotore (Bannister e Kouzarides et al., 1996). A sostegno di questa possibilità, un recente lavoro ha dimostrato che gli inibitori della deacetilasi istonica possono ridurre la morte cellulare dovuta all'espressione di proteine poliglutamina espanse (McC Campbell et al., 2001; Steffan et al., 2001).

Queste ricerche suggeriscono che l'interruzione della funzione della CBP è uno dei meccanismi centrali della patologia da ripetizioni di poliglutamina. Ma il CBP è un coattivatore trascrizionale specifico non soltanto della CREB, tuttavia il contributo dei membri della famiglia della CREB, quando essi non sono funzionanti, nelle malattie neurodegenerative non è ancora chiaro. Inoltre, linee sperimentali che utilizzano analisi di espressione genica hanno dato un ulteriore chiarimento sul ruolo potenziale della CREB in questi disordini. Infatti recenti studi genetici sui topi hanno mostrato che la mancanza della CREB e della CREM nel SNC dopo la nascita produce una progressiva neurodegenerazione, ma non in tutto il SNC (Mantamadiotis et al., 2002). Questo modello è molto interessante perché questo schema di perdita neuronale è strettamente correlato con quello che si osserva in molte malattie cliniche neurodegenerative, incluso HD. Questi sofisticati modelli genetici serviranno probabilmente come potente mezzo per comprendere i modi con cui la CREB supporta il mantenimento neuronale, e a delineare il ruolo dei fattori della famiglia CREB nelle molte malattie nelle quali sono implicati.

#### **2.8.4 La CREB nella Corea di Huntington**

Il meccanismo attraverso il quale la mancata attività della CREB può portare ad uno stato patologico è poco conosciuto. Fanno eccezione il gruppo delle malattie associate ad una espansione delle triplette CAG, tra cui la corea di Huntington (HD).

E' stato dimostrato che gli eventi molecolari che portano allo stato patologico tipico della corea di Huntington, coinvolgono direttamente la CREB e i fattori che intervengono nel modulare la sua attività come CBP, TAF<sub>II</sub>130 e Sp1 (Li & XJ, 2004; Dawson TM, 2002).

Diversi gruppi hanno trovato che la proteina huntingtina mutata forma degli aggregati nucleari che contengono CBP (CREB-binding protein) (Nucifora et al,2001; Steffan et al, 2000), compromettendo l'attività della CREB e la trascrizione dei geni ad essa associati.

Questi includono geni per la sintesi del BDNF e altri implicati nei processi che vanno dalla neurotrasmissione al metabolismo del colesterolo (Bibb,JA et al, 2000). Nucifora e colleghi

hanno recentemente mostrato che l'associazione della proteina huntingtina mutata con CBP determina non solo un'alterata espressione genica ma anche tossicità cellulare (Jiang H., 2006).

La deplezione della CREB nel cervello può causare una neurodegenerazione selettiva nell'ippocampo e nello striato (Mantamadiotis, 2002). Una disfunzione dell'espressione genica mediata da CBP e Sp1 è stata osservata in modelli murini di HD (Luthi-Carter, 2002).

L'interazione dell'htt mutata con questi fattori di trascrizione può avvenire a livello di differenti siti legame. Molti fattori di trascrizione, CBP, TBP, TAF130 contengono un dominio poly-Q (Nucifora FC, 2001; Steffan, 2001 ; Huang CC., 1998), per questo motivo

si pensa che il sito di interazione sia proprio questo tratto poliglutamminico. La CREB-binding protein (CBP) ha anche un'attività acetiltransferasica ed acetila gli istoni legati ai nucleosomi, un processo essenziale per il rimodellamento della cromatina e l'attivazione

della trascrizione genica (Bannister, 1996). L'htt mutata è in grado di ridurre i livelli di istoni acetilati perché in grado di interagire con i siti di acetilazione di HAT e CBP (Steffan, 2001 ;

MaCampbell, 2001). La somministrazione di inibitori della deacetilazione istonica (HDAC)

sono in grado di migliorare la neurodegenerazione in modelli di malattie da triplette (Huges, 2002). Questa ipotesi è stata dimostrata da molti studi preclinici in cui sono stati testati molecole quali il sodio butirato, un inibitore della deacetilazione istonica (Ferrante RJ., 2003; Gardian, 2005; Minamiyama, 2004).

## LA NOSTRA RICERCA

---

Gli eventi molecolari che portano alla corea di Huntington coinvolgono direttamente la CREB e i fattori che intervengono nel modulare la sua attività (CBP, TAF<sub>II</sub>130) (Dawson and Gunty,2002). Questi fattori possono legarsi all'htt mutata ed essere sequestrati negli aggregati nucleari (Nucifora et al,2001; Steffan et al, 2000), compromettendo l'attività della CREB e la trascrizione dei geni ad essa associati. Questi includono geni per la sintesi del BDNF e altri implicati nei processi che vanno dalla neurotrasmissione al metabolismo del colesterolo (Bibb et al, 2000). È stato dimostrato, in topi transgenici, che l'inibizione della trascrizione genica mediata dalla CREB contribuisce alla patologia di huntington (Nucifora et al., 2001; Luthi-Carter et al., 2000). Gines e colleghi hanno osservato che in condizioni fisiologiche tutte le cellule esprimono CBP nel loro nucleo, in linee cellulari mutate per l'HD, invece, solo il 18% della popolazione mostrava CREB-binding protein (Gines et al., 2003).

Quindi, farmaci diretti ad impedire la perdita della funzione della CREB possono essere considerate come un potente strumento per curare le malattie neurodegenerative come la corea di Huntington. E' stato dimostrato che il rolipram, un inibitore della fosfodiesterasi tipo IV (PDE4), incrementa la fosforilazione della CREB (Hosoi R, 2003; Jacob C, 2004; Lee HT, 2004). E' stato anche osservato che questo farmaco ha un effetto protettivo contro il danno neuronale dato dall'ischemia (Block F, 1997), contro i problemi alla memoria dati dall'embolia nei ratti (Nagakura A, 2002; Gong B, 2004) e più recentemente è stato dimostrato che il rolipram ha un effetto neuroprotettivo in lesioni eccitotossiche (Block F L. M., 2004). È noto che il differenziamento e la sopravvivenza dei neuroni striatali, e l'attività delle sinapsi corticostriatali, dipendono, anche, in modo specifico dal BDNF (Widmer HR, 1994 ; Alcántara S, 1997). L'htt normale, stimola la produzione di BDNF, favorendo la

trascrizione del gene per il BDNF .Viceversa, la proteina mutata perde questo effetto e riduce anche la sua attività su due degli altri elementi promotori (Zuccato C C. A., 2001).

Nel tentativo di capire le proprietà che rendono alcuni sottotipi neuronali più resistenti alla Corea di Huntington, il primo obiettivo di questa ricerca è stato quello di determinare se la diminuzione della CREB attiva (pCREB) coinvolge tutti i neuroni striatali o alcune popolazioni cellulari più vulnerabili all'HD. In questo modo la variazione dell'attività della CREB potrà essere correlata alla diversa suscettibilità dei neuroni striatali nell'HD. Per portare avanti questi studi sono stati utilizzati come modelli sperimentali ratti lesionati con QA e topi transgenici R6/2. Avendo osservato che c'era una relazione tra la diversa vulnerabilità dei neuroni e i differenti livelli di CREB nella sua forma attiva, il passo successivo di questo studio è stato quello di investigare se il rolipram, in grado di indurre un incremento della fosforilazione della CREB, potesse essere un valido strumento per combattere la degenerazione eccitossica striatale. In particolare, abbiamo cercato di determinare se il rolipram, somministrato nei nostri modelli era capace di indurre un risparmio dei neuroni striatali, da una parte, e un parallelo incremento dell'attivazione della pCREB e del BDNF dall'altra.

## MATERIALI E METODI

---

Ratti maschi Wistar (Harlan, Italy) sono stati usati per questi studi. Gli animali pesavano 200-220 g quando sono state effettuate le procedure chirurgiche. Tutte le ricerche sono state condotte in accordo con la Direttiva del Consiglio della Comunità Europea del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) e adottata dalla Fondazione Santa Lucia Animal Care e Use committee.

### 3.1 LESIONE ECCITOTOSSICA E SOMMINISTRAZIONE DEL FARMACO

Il protocollo chirurgico da iniezione da Acido Quinolinico è stato presentato in accordo alle procedure descritte precedentemente (Fusco FR Z. C., 2003). In sintesi, 60 animali sono stati profondamente anestetizzati con un mix di ketamina (0.66 ml/Kg) e xilazina (0.16 ml/kg) somministrata intraperitonealmente, e posizionati in un apparecchio stereotassico David Korf Instruments (Tujunga, CA). A trenta animali è stato somministrato QA (100mM; Sigma, St Louis, MO, USA), in volume di 1  $\mu$ l, che è stato iniettato nello striato dell'emisfero sinistro seguendo le seguenti coordinate: anteroposteriore, +0.7; medio-laterale, -3.0; dorso-ventrale, -5.0mm. Trenta animali sono stati operati falsamente per essere utilizzati come controllo. Dopo il lesionamento, gli animali sono stati alloggiati separatamente con accesso libero a cibo ed acqua *ad libitum* fino ad 8 settimane per valutare possibili cambiamenti dell'attivazione della CREB variabili con il tempo. Gli animali sono stati divisi in tre gruppi di trattamento:

- ✓ 20 animali sono stati trattati giornalmente con 1ml di rolipram, via intraperitoneale in concentrazione 0.15 mg/kg,
- ✓ 20 sono stati trattati con 1 ml di rolipram in concentrazione 1.5 mg/kg,
- ✓ 20 animali come controllo.

### **3.2 COLONIA DEI TOPI TRANSGENICI R6/2**

I topi emizigoti R6/2 (B6CBA-tg(HDexon1)62Gpb/1j) esprimono l'htt mutata e portano un transgene per l'estremità 5' del gene umano per l'HD con un numero di triplette CAG che varia da 115 a 159. Per il mantenimento della colonia è stato utilizzato lo schema di accoppiamento consigliato dai laboratori Jackson. In sintesi una femmina emizigote viene fatta accoppiare con topi normali B6BAF1/J della linea CBA X C57BL/6 F<sub>1</sub>). La femmina emizigote è stata ottenuta da una femmina wt in cui è stato trapianto l'ovario portatore della mutazione. Le coppie per il mantenimento della colonia sono state fornite dai laboratori Jackson (Bar Harbor, ME). Tutte gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le norme vigenti in materia di trattamento degli animali di laboratorio stabilite dal Consiglio della Comunità Europea del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) e adottata dalla Fondazione Santa Lucia Animal Care e Use committee. La prole veniva svezzata all'età di 22giorni e genotipizzata mediante reazione di PCR eseguita secondo il protocollo modificato da Mangiarini et al., (1996). All'inizio del trattamento giornaliero con il rolipram gli animali avevano 1 mese di età e venivano suddivisi in tre gruppi:

- ✓ R6/2 trattati con iniezioni intraperitoneali di soluzione fisiologica (0.9%).
- ✓ R6/2 trattati con iniezioni intraperitoneali di rolipram (1.5 mg/kg/day) disciolto in soluzione fisiologica.
- ✓ Topi wild-type trattati con soluzione fisiologica

### 3.2.1 GENOTIPIZZAZIONE DELLA COLONIA R6/2

I topi della nostra colonia sono stati genotipizzati seguendo il protocollo fornito dai laboratori della Jackson per distinguere gli animali con il transgene  $t^+/t^-$  (R6/2) dagli animali wild-type. La PCR è stata eseguita utilizzando i primer per il transgene (5'-CGG-CTGAGGCAGCAGCGGCTGT-3' e 5'-GCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCC-3')

#### **Primer Sequences:**

oIMR1594	5'-CCg-CTC-AGG-TTC-TGC-TTT-TA-3'
oIMR1595	5'-GGC-TGA-GGA-AGC-TGA-GGA-G-3'
oIMR1596	5'-TGGAAGGACTTGAGGGACTC-3'

Questo protocollo permette di utilizzare due coppie di primers. La prima coppia (**oIMR1594** e **oIMR1595**) si lega alle estremità della regione del gene contenente le triplette CAG espanse e dà la possibilità di monitorare l'ampiezza del tratto CAG. Pertanto amplificheremo un frammento genico di 284bp nel caso in cui il nostro allele contenga solo 21 copie di CAG(wild.type), oppure un frammento di 611bp nel caso in cui il nostro allele contenga 130 triplette CAG (R6/2). La seconda coppia (**oIMR1594** e **oIMR1596**) viene utilizzata per verificare la presenza o assenza del transgene ma non fornisce informazioni sul numero delle triplette, in questo caso amplificheremo un frammento di 170bp.

<b>Reaction Components</b>	<b>Final Concentration</b>	<b>total volume</b>
10XAMBuffer	1X	5 $\mu$ l
25mMMgCl <sub>2</sub>	2mM	2 $\mu$ l
2.5mMdNTP	0.2mM	1 $\mu$ l
20 $\mu$ MoIMR1594	0.4 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
20 $\mu$ MoIMR1595	0.4 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
20 $\mu$ MoIMR1596	0.4 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l
DMSO	1X	5 $\mu$ l
5U/ $\mu$ l Taq Pol.	0.025 U/ $\mu$ l	0.4 $\mu$ l
DNA(1 $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	QS to 12 $\mu$ l	34.2 $\mu$ l

Reaction volume = 50  $\mu$ l

**Thermal Cycling Conditions:**

94°C	3 min
94°C	30''-35 times
58°C	1 min-35times
72°C	1 min-35 times
72°C	2 min

\*DNA è stato estratto dalle code di topo.

<b>+/-</b>	<b>+/-</b>	<b>Wt</b>
284 bp/611bp	284bp/170bp	284bp

Dopo l'amplificazione con PCR, il prodotto di reazione è stato fatto correre su gel agarosio al 2%.

### **3.3 IMMUNOISTOCHIMICA**

I ratti lesionati con QA sono stati sacrificati ad intervalli di tempo variabili dalla lesione (24h, 48h, 1 settimana, 2 settimane, 6 settimane).

I topi transgenici della linea R6/2 sono stati sacrificati considerando come punto di eutanasia il momento in cui non erano più in grado di girarsi su stessi una volta posizionati sul dorso (in accordo con Stack e colleghi 2006).

Gli animali sono stati perfusi transcardialmente in profonda anestesia con 250-300 ml (60 ml per i topi) di soluzione salina contenente 0.05 ml di eparina, seguita da una stessa quantità di paraformaldeide al 4% in soluzione salina. I cervelli sono stati rimossi e postfissati overnight a 4°C, crioprotetti in una soluzione di 10% di saccarosio e 20% di glicerolo in buffer fosfato (PB) con sodio azide al 0,02% per 48h a 4°C (Fusco et al., 1999). I cervelli sono stati congelati e tagliati con un microtomo, ottenendo sezioni seriate di 40 µm di spessore.

Due effetti sono stati presi in considerazione in questo studio prima ed dopo il trattamento con rolipram: (1) l'analisi dell'espressione del BDNF e (2) il livello dell'attivazione della pCREB.

#### **3.3.1 IMMUNOFLUORESCENZA PER L'ANALISI DELL'ATTIVAZIONE DELLA CREB**

L'analisi qualitativa e quantitativa del materiale processato per la forma fosforilata della CREB è stata circoscritta alla regione dello striato in entrambi i modelli sperimentali.

E' stata utilizzata una immunofluorescenza a doppia marcatura per identificare l'intensità della CREB attivata nei neuroni spiny di proiezione striatali e nelle diverse sottopopolazioni di interneuroni . In sintesi, le sezioni sono state incubate con un cocktail di un anticorpo contro la CREB con il residuo Ser-133 fosforilato (rabbit anti-fosfo-CREB, Upstate, NY) ed ognuno dei seguenti marcatori cellulari specifici: anticorpo anti-calbindina-28kDa (mouse anti-CALB, SIGMA, St.Louis, MO) per valutare l'espressione dei livelli di pCREB nei

neuroni di proiezione medium spiny; mouse anti-colinacetiltransferasi (ChAT; Chemicon) per valutare l'intensità della pCREB nei neuroni colinergici, mouse anti-ossido nitrico sintasi (NOS, Sigma, St-Louis, MO) per studiare la distribuzione della pCREB negli interneuroni somatostatinerfici; mouse anti-PARV (Chemicon) per studiare i livelli di espressione della CREB fosforilata nella sottopopolazione degli interneuroni striatali contenenti parvalbumina ed infine mouse anti-CALR per valutare l'intensità della pCREB nei neuroni contenenti calretinina. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti 1:200 (eccetto la pCREB che è stata utilizzata 1:300) in una soluzione 0.1M di buffer fosfato (PB) contenente Triton X 0,3% e 0.02 sodio azide per 72h a +4°C. Dopo tre lavaggi di 15 minuti in PB, le sezioni sono state incubate con un cocktail di un anticorpo secondario goat anti-rabbit Cy2-coniugato (per evidenziare la pCRB con una fluorescenza verde) e un anticorpo secondario donkey anti-mouse Cy3-coniugato (per la fluorescenza rossa degli altri marcatori), entrambi gli anticorpi secondari fluorescenti (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) sono stati incubati per 2 h a temperatura ambiente. Il tessuto è stato montato su vetrini, e coperto con GEL-MOUNT™ ed esaminato con un microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioscope 2) e un microscopio confocale CLSM (Zeiss LSM510) utilizzato per acquisire tutte le immagini.

Per valutare l'intensità della immunomarcatura della fosfo-CREB, come misura indiretta dell'attivazione della CREB, è stata svolta una analisi di immagine dei neuroni immunoreattivi alla CALB e agli altri marcatori tramite il software Zeiss LSM.

### **3.3.2 Quantificazione dell'espressione della CREB fosforilata**

L'analisi quantitativa delle sezioni sottoposte a doppia immunofluorescenza è stata eseguita su immagini digitali acquisite con CLSM usando un obiettivo 40X. Sono state prese in considerazione sezioni seriate, regolarmente distanziate tra di loro in modo da ricoprire tutta l'estensione dello striato. In queste sezioni l'intensità è stata calcolata in 250 neuroni immunoreattivi alla CALB in un'area che circonda il sito di lesione nel caso dei ratti

lesionati con QA, oppure, nei cervelli di topo, in sei aree microscopiche acquisite a 40x in modo da ricoprire l'intera area striatale in senso medio-laterale e rostro-caudale.

I livelli di espressione della forma attiva della CREB sono stati ottenuti come misura indiretta dell'intensità di fluorescenza della pCREB nei neuroni striatali utilizzando il sistema di analisi d'immagine (Zeiss LSM software ) del microscopio confocale (CLSM).

L'intensità di fluorescenza veniva espressa in unità arbitrarie.

### **3.4 ANALISI DEL BDNF NEI NEURONI DI PROIEZIONE STRIATALE**

In questo esperimento sono stati misurati i livelli di BDNF sui topi della linea transgenica R6/2 e nei ratti lesionati con QA e perfusi considerando solo due intervalli di tempo dopo la lesione (2 e 8 settimane). Entrambi i gruppi sono stati trattati con rolipram. In un set di esperimenti è stata impiegata un' immunofluorescenza a singola marcatura utilizzando un anticorpo diretto contro fattori neurotrofici prodotti dal cervello (anti-mouse BDNF, Immunological Sciences, Italy). Dopo una pre-incubazione con l'appropriato siero, le sezioni sono state incubate con anticorpo Triton X 0.3% e 0.02 sodio azide per 72 h a +4°C. Successivamente, le sezioni sono state lavate tre volte per 15 minuti in PB 0.1 M e poi incubate con un anticorpo secondario anti-mouse cianina 2 (Cy2) per 2 h a temperatura ambiente. Il tessuto è stato montato su vetrini, e coperti con GEL-MOUNT™ ed esaminati con un microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioscope 2), e un microscopio confocale (CLSM; Zeiss LSM 510) è stato utilizzato per acquisire le immagini. Per valutare l'intensità dell'immunomarcatura del BDNF, è stata svolta un'analisi dell'immagine dei neuroni immunoreattivi al BDNF utilizzando il software Zeiss LSM. L'intensità dell'immunomarcatura del BDNF è stata calcolata in 250 neuroni di proiezione in un'area che circonda il sito di lesione. I neuroni immunoreattivi al BDNF sono stati studiati in ognuna delle tre aree rostrocaudali delle sezioni sia nei ratti lesionati, sia nei ratti fintamente operati per ogni time points.

In un secondo set di esperimenti è stata invece utilizzata una doppia marcatura, utilizzando un protocollo precedentemente descritto (Fusco et al., 2003). Le sezioni, previa incubazione con l'appropriato siero, sono state incubate con una miscela dell'anticorpo diretto contro fattori neurotrofici prodotti dal cervello (anti-mouse BDNF, Immunological Sciences, Italy) e l'anticorpo mouse anti-CALB-28kDA (Sigma, St Louis, MO) in una soluzione 0.1M di buffer fosfato (PB) contenente Triton X 0,3% e 0.02 sodio azide per 72h a +4°C. Dopo tre lavaggi di 15 minuti in PB, le sezioni sono state incubate con un cocktail di anticorpo secondario goat anti-rabbit Cy2-coniugato (per evidenziare il BDNF con una fluorescenza verde) e anticorpo secondario donkey anti-mouse Cy3-coniugato (per la fluorescenza rossa della CALB), entrambi gli anticorpi secondari fluorescenti (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) sono stati incubati per 2 h a temperatura ambiente. Il tessuto è stato montato su vetrini, e coperto con GEL-MOUNT™ ed esaminato con un microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioscope 2), e un CLSM (Zeiss LSM510) utilizzato per acquisire tutte le immagini.

L'intensità di fluorescenza del BDNF è stata stimata nei neuroni di proiezione CALB-positivi. L'analisi è stata effettuata su un campo microscopico di 1mm quadrato su sezioni seriate (una ogni tre sezioni in senso rostro caudale) per ognuno dei soggetti di ogni gruppo. Tutte le immagini acquisite al confocale sono state analizzate utilizzando il software Zeiss LSM.

### **3.5 ANALISI STATISTICA**

I dati raccolti sono stati analizzati per comparare :

- ✓ i livelli di intensità della pCREB nei diversi tipi neuronali striatali nel modello eccitotossico da lesione con QA e nei topi R6/2.
- ✓ l'effetto del rolipram sull'attivazione della CREB e sull'espressione del BDNF nello striato dei differenti gruppi lesionati con QA e nei topi transgenici R6/2.

L'analisi statistica è stata effettuata per ogni gruppo di esperimenti con un test incrociato ANOVA seguito dal test HSD Turkey. I valori di P con meno di 0.05 di differenza sono stati considerati statisticamente significativi.

# RISULTATI

---

## 4.1 ANALISI SEMIQUANTITATIVA DELLA PCREB NEL MODELLO QA

I dati dello studio di doppia immunofluorescenza hanno evidenziato che i livelli basali di pCREB, nei ratti controllo, sono significativamente più alti nei neuroni di proiezione rispetto agli interneuroni striatali (fig. 4.1). Dall'analisi dell'andamento temporale della modulazione dell'attività della CREB nei ratti lesionati con acido quinolinico è stato osservato che l'intensità della CREB nella sua forma attiva aumentava in tutte le sottopopolazioni striatali una settimana dopo la lesione (fig. 4.4); a questo intervallo di tempo, nei neuroni di proiezione i livelli di fosfo-CREB diminuiscono drasticamente e soltanto una piccola percentuale di neuroni calbindina positivi contengono pCREB anche dopo 6 settimane dalla lesione (fig. 4.2). L'intensità dei livelli di CREB attivata diminuisce drasticamente nelle due sottopopolazioni di interneuroni più vulnerabili alla degenerazione, quelli contenenti parvalbumina e quelli positivi alla calretinina (fig. 4.2). È interessante notare, invece, che gli interneuroni colinergici e somatostatinerfici, i più resistenti all'eccitotossicità da QA, sono gli unici tipi neuronali che riuscivano a mantenere i livelli di pCREB stabili fino a sei settimane dopo la l'induzione dell'eccitotossicità da QA. In questo caso è stato osservato una iniziale diminuzione della CREB attivata a 24h e 48h dopo la lesione, a questo punto i livelli di fosfo-CREB raggiungevano un plateau che si manteneva costante fino a sei settimane (fig. 4.3). questi risultati mostravano anche che nello striato vi è una modulazione dell'espressione della CREB attivata tempo-dipendente.

## 4.2 EFFETTI DEL ROLIPRAM NEL MODELLO QA

Per studiare gli effetti del rolipram sull'espressione della CREB fosforilata e del BDNF nella popolazione dei neuroni medium spiny, sono state utilizzate delle sezioni ottenute da ratti lesionati con QA e trattati con rolipram per due e otto settimane dalla lesione.

#### **4.2.1 EFFETTI DEL ROLIPRAM SULLA FOSFORILAZIONE DELLA CREB NEI RATTI LESIONATI**

Dall'analisi delle immagini acquisite mediante confocale (CLSM) è emerso che l'attività funzionale della CREB(calcolata come intensità di fluorescenza della pCREB) aumentava in modo significativo nei neuroni di proiezione dello striato in entrambi i gruppi di ratti lesionati, quelli trattati con 0.5mg/kg/day di rolipram e quelli che ne ricevevano 1.5mg/kg/day, comparati con i ratti QA lesionati e ai quali veniva somministrato solo della soluzione fisiologica. Questo effetto era evidente ad entrambi i time points, anche se l'effetto sembrava essere più significativo ad 8 settimane (fig.4.5). Infatti, il rolipram alla concentrazione di 1.5 mg/kg/day mostrava un effetto maggiore sulla fosforilazione della CREB a 8 settimane, con un incremento del 120% dell'intensità della pCREB comparata con quella del gruppo veicolo, mentre il rolipram somministrato alla concentrazione di 0.15 mg/kg portava ad un incremento della CREB pari al 112%. In sintesi, da questi studi è emerso che il trattamento con rolipram riesce a portare i livelli della pCREB a valori simili a quelli osservati nei ratti controllo(Fig 4.5 F,G).

#### **4.2.2 EFFETTI DEL ROLIPRAM SULL'ESPRESSIONE DEL BDNF NEI RATTI LESIONATI**

I dati raccolti da questi esperimenti mostravano che il rolipram non influenzava significativamente i livelli di BDNF nello striato di ratti QA lesionati. In particolare, due settimane dopo la lesione i livelli di BDNF degli animali lesionati e trattati con soluzione fisiologica erano comparabili con quelli osservati negli animali trattati con il rolipram ad entrambe le concentrazioni(0.15mg/kg e 1.5mg/kg). L'espressione del BDNF restava costante fino ad otto settimane dopo la lesione. Questi risultati sono riassunti nella fig 4.6.

## **4.3 EFFETTI DEL ROLIPRAM NEL MODELLO MURINO R6/2**

### **4.3.1 ANALISI SEMIQUANTITATIVA DELLA PCREB NEI TOPI R6/2 DOPO TRATTAMENTO CON ROLIPRAM**

Come mostrato in fig.4.7 dagli studi di doppia immunofluorescenza è emerso che l'intensità di fluorescenza della pCREB aumentava in modo significativo nei neuroni di proiezione dello striato dei topi R6/2 trattati con soluzione fisiologica rispetto ai topi wild.type. Questo dato conferma gli studi effettuati da Gines e colleghi (Gines et al., 2003) sull'attività della CREB nella corea di Huntington.

L'intensità della CREB nella sua forma attiva aumentava invece nei topi R6/2 in cui veniva somministrato il rolipram alla concentrazione di 1.5mg/kg/day. Questo incremento era significativamente più alto se comparato con i livelli di CREB osservati sia in topi R6/2 non trattati che in topi wild-type (fig.4.7 J).

### **4.3.2 ANALISI SEMIQUANTITATIVA DEL BDNF IN TOPI R6/2 DOPO TRATTAMENTO CON ROLIPRAM**

Studi precedenti hanno riportato che l'espressione del BDNF diminuiva drasticamente sia in pazienti affetti da HD che in modelli murini (Zuccato et al., 2001). La trascrizione del gene che codifica per il BDNF dipende dall'attività della CREB. Pertanto è stato studiato se gli incrementi della forma attiva di CREB portavano ad un aumento anche dei livelli di BDNF. Così com'era stato ipotizzato, nei topi R6/2 trattati giornalmente con rolipram l'espressione proteica di BDNF era aumentata significativamente se comparata sia a quella osservata negli R6/2 che assumevano soluzione fisiologica che nei topi wild-type (fig 4.8).

# DISCUSSIONE

---

## **5.1 ESPRESSIONE DELLA PCREB E DEL BDNF NEL MODELLO ECCITOTOSSICO DA QA DOPO TRATTAMENTO CON ROLIPRAM**

Studi precedenti hanno dimostrato una diminuita attività della CREB in modelli animali per l'HD (Sugars KL, 2004 ; Kazantsev A, 1999 ), compromettendo la trascrizione dei geni ad essa associati (Shimohata T, 2000 ; Nucifora FC, 2001). Questi includono geni per la sintesi del BDNF e altri implicati nei processi di sopravvivenza cellulare (Zuccato et al., 2001; Sipione et al., 2002). Tanaka e colleghi hanno osservato che un'iperespressione della pCREB era correlata alla sopravvivenza cellulare (Tanaka et al., 2000). Le caratteristiche che rendono le sottopopolazioni striatali differenzialmente suscettibili alla degenerazione nell'HD è stato oggetto di diversi studi (Meade, 2002; Calabresi P, 2000 ). Questa ricerca mostra per la prima volta un pattern dell'attivazione della CREB differente in ogni popolazione striatale dopo lesione eccitotossica e permette di stabilire una diretta relazione tra l'intensità della CREB attivata e la diversa vulnerabilità dei neuroni striatali. Infatti questi studi mostrano come l'intensità della pCREB sia drasticamente diminuita nei neuroni di proiezione dopo lesione da QA rispetto agli interneuroni. Questo effetto è in relazione alla loro maggiore vulnerabilità all'eccitotossicità. Ad eccezione delle popolazioni parvalbuminergiche e calretininergiche in cui l'attivazione della CREB era completamente assente a sei settimane dalla lesione, le altre due popolazioni di interneuroni striatali, i colinergici e i somatostatinerghi, mostravano livelli di CREB fosforilata costante fino a sei settimane. La selettiva resistenza degli interneuroni colinergici e parvalbuminergici sarebbe correlata al loro contenuto e alla loro capacità di indurre e mantenere attivo il fattore di trascrizione CREB. È interessante notare che i neuroni colinergici non solo sono quelli più resistenti alla degenerazione nell'HD e dopo lesione eccitotossica, ma sono anche quelli più

ricchi di htt normale. Al contrario, i neuroni contenenti parvalbumina sono quelli che hanno quantità di htt normale più basse (Fusco et al., 1999).

Nonostante sia stato ampiamente dimostrato che l'effetto neuroprotettivo dell'htt normale sia dovuto alla sua capacità di promuovere la produzione di BDNF nella corteccia (Zuccato et al., 2001; Fusco et al., 2003), non si può escludere la possibilità che l'htt giochi un ruolo nell'attivare i meccanismi che permettono la fosforilazione della CREB nei neuroni striatali.

Un ulteriore aspetto interessante che è emerso dal nostro lavoro è l'effetto benefico del rolipram sul quadro neuropatologico in entrambi i modelli sperimentali utilizzati.

Alla luce di questo, i nostri studi confermano ed espandono la letteratura esistente che riguarda il rolipram e i suoi effetti sulla eccitotossicità e sull'infiammazione (Block et al., 2001; Block et al., 2004). La novità introdotta dal nostro lavoro consiste nel fatto che il nostro modello è l'unico che simula la patologia striatale da HD in termini di degenerazione o di risparmio dei differenti tipi di neuroni. Il modello utilizzato da Block e collaboratori, a causa del dosaggio dell'acido quinolinico, non riproduce tale patologia.

Per mezzo di tecniche di immunistochemica, noi abbiamo analizzato da un lato l'attività funzionale della CREB e dall'altro l'espressione a livello proteico del BDNF sulla patologia HD-simulata, utilizzando ratti lesionati con QA e topi R6/2, in seguito a somministrazione del rolipram. È stato precedentemente mostrato che l'inibizione della fosfodiesterasi-4 mediata dal rolipram è capace di incrementare il livello della CREB attivata (Lee et al., 2004).

Studi precedenti hanno mostrato che il rolipram ha un effetto protettivo contro il danno neurale in seguito a ischemia globale e contro i difetti di memoria dovuti all'embolia sperimentale nei ratti (Nagakura et al., 2002). Sono di certo dimostrate somiglianze istologiche tra HD e ischemia cerebrale (Meade et al., 2000). Comunque i primi lavori di Block e al., (2001) hanno mostrato che il rolipram è capace di indurre una neuroprotezione nel modello di eccitotossicità nel ratto ottenuta con un alto dosaggio di acido quinolinico.

Dunque, i nostri dati sono in accordo non solo con questi articoli, ma aggiungono una precisa e specifica visione dell'uso del rolipram per la degenerazione da HD. Il rolipram inoltre è assodato essere efficace nella regolazione della fosforilazione della CREB nel nostro modello di HD nel ratto (DeMarch Z, 2007). Tale scoperta conferma le precedenti osservazioni in altri sistemi sperimentali (Cabranes A, 2005; Monti B, 2006).

La diminuzione dei livelli di cAMP è stata dimostrata nella malattia di Huntington (Hebb AL, 2004; Gines S, 2003; Lee HT, 2004). Il cAMP intracellulare è generato dall'adenilato ciclasi, che è regolata da proteine G associate con recettori di neurotrasmettitori presenti sulla membrana. Il cAMP è degradato dalle fosfodiesterasi, e in particolare dalla fosfodiesterasi 4 (PDE4) che ricopre un ruolo chiave nella regolazione neuronale dei livelli di cAMP (Jacob et al., 2004; Nakagawa et al., 2002). Questo enzima è la fosfodiesterasi più grande presente nel cervello ed è stato visto essere abbondante nello striato (Cherry JA, 1999). Comunque, il rolipram incrementa i livelli di CREB attivata attraverso un meccanismo mediato da una inibizione della PDE4.

I nostri risultati mostrano che, a 2 settimane, un effetto positivo sulla fosforilazione della CREB si ottiene con basse concentrazioni di rolipram. Anche se sembra prematuro, questi dati possono essere dovuti all'effetto simultaneo del farmaco sia su PDE4 che su ICER (inducibile cAMP early repressor), un inibitore endogeno della trascrizione mediata dalla CRE (Cho et al., 2005). Questi effetti inibitori possono essere più evidenti ad una concentrazione più alta di farmaco. A 8 settimane, comunque, si può raggiungere un nuovo equilibrio e si ottiene un'induzione permanente dell'attivazione della CREB.

Comunque, la discrepanza osservata a 2 settimane tra la riduzione delle dimensioni della lesione e la bassa attivazione relativa della pCREB può essere dovuta alla simultanea attivazione di altri meccanismi di neuroprotezione. Un possibile meccanismo che può ridurre la tossicità striatale è la modulazione che il rolipram effettua sul TNF e sulle interleuchine (Block et al., 2001; Jimenez et al., 2001).

Dato che il BDNF (brain-derived neurotrophic factor) si riduce drammaticamente nell'HD (Zuccato et al., 2001) e nel modello QA di malattia nel roditore (Fusco et al., 2003), e che il rolipram invece è capace di aumentarne i livelli, noi abbiamo studiato anche l'espressione di BDNF nei nostri animali trattati con il rolipram.

I nostri risultati hanno dimostrato che il rolipram non interferisce con i livelli di BDNF nello striato. Questi risultati non sono inaspettati dato che è noto che il BDNF striatale viene sintetizzato nella corteccia e trasportato in via anterogradamente nello striato (Zuccato et al., 2001). Quindi, se la via corticostriatale è interrotta da una degenerazione eccitotossica del target, un cambiamento del livello del BDNF non avviene.

L'effetto del rolipram sull'attività binding della CRE è stata precedentemente studiata in un modello di depressione sul ratto (Itoh T, 2004). Gli autori hanno descritto una non influenza sull'attività CRE-binding nello striato in seguito a trattamento con solo rolipram, che può sembrare in conflitto con i nostri risultati. E' peraltro noto che questi dati sono stati presi dopo 10 giorni di trattamento con rolipram, e quindi l'effetto cronico del farmaco poteva non essere osservato.

In questo studio noi dimostriamo che gli effetti del rolipram sono benefici sulla degenerazione striatale nel nostro modello da acido quinolinico, e che avviene un incremento della fosforilazione della CREB a tutti i time points studiati in quelle cellule che sono più sensibili alla degenerazione (Giampa C, 2006).

Il rolipram è un farmaco relativamente sicuro, i cui effetti collaterali includono riduzione di appetito e perdita di peso (Fujimaki K, 2000; Nibuya M, 1996). I nostri studi chiariscono la possibilità di utilizzare il rolipram come un potente mezzo per combattere l'HD.

## **5.2 ANALISI DEI LIVELLI DI pCREB E DI BDNF NEI TOPI R6/2DOPO TRATTAMENTO CON ROLIPRAM**

La diversa attività della CREB e la diversa espressione del BDNF sono stati studiati anche nel modello murino di HD, i topi R6/2. In questo modello è stato inserito il transgene per

l'htt mutata, in particolare la porzione 5' terminale con un numero di ripetizioni di triplette CAG di 150. È stato dimostrato che gli eventi molecolari che portano allo stato patologico tipico della corea di Huntington, coinvolgono direttamente la CREB e i fattori che intervengono nel modulare la sua attività come CBP, TAF<sub>II</sub>130 e Sp1 (Li & XJ, 2004)(Dawson and Guntz,2002). Diversi gruppi hanno trovato che la proteina huntingtina mutata forma degli aggregati nucleari che possono sequestrare molti fattori o coattivatori della trascrizione genica quali ad esempio la CBP (CREB-binding protein) (Nucifora et al,2001; Steffan et al, 2000), compromettendo l'attività della CREB e la trascrizione dei geni ad essa associati. È stato anche dimostrato che l'htt mutata può sopprimere l'espressione di diversi recettori perché in grado di inibire il legame della CREB ai siti promotori presenti sul gene target (Chiang MC, 2005 ). È stato precedentemente detto che la trascrizione del gene che codifica per il BDNF, la cui espressione diminuisce nei modelli sperimentali di HD, non solo è regolata dall'htt ma è sotto il controllo della CREB (Lonze BE, 2002). Il promotore III del gene BDNF ha una sequenza che lega l'elemento CRE (Zuccato C C. E., 2007 ).

L'altro aspetto che è emerso da questo studio è stato l'effetto benefico del rolipram anche in topi R6/2. Questo composto è capace di aumentare significativamente i livelli di CREB nei neuroni striatali dei topi R6/2 e trattati con rolipram rispetto a quelli non trattati o ai topi wild-type. Questi topi, al contrario di quanto avevamo osservato nei modelli QA, mostravano anche degli aumenti significativi nei livelli di BDNF. Infatti , il BDNF viene prodotto nella corteccia e trasportato in senso anterogrado allo striato (Altar CA, 1997 ; Conner JM, 1997). Nel modello eccitotossico il sistema corticostriatale viene danneggiato e questo potrebbe spiegare perché nello studio precedente non riuscivamo ad osservare degli effetti significativi sull'espressione del BDNF. Nei topi R6/2 l'aumento dell'attivazione della CREB potrebbe avere un ruolo chiave perché le connessioni anatomiche non sono danneggiate.

In conclusione, questo studio mostra per la prima volta gli effetti benefici del rolipram nei modelli sperimentali per lo studio della corea di Huntington e questi effetti sono principalmente correlati ad un aumento della fosforilazione della CREB nei neuroni di proiezione striatale, i più vulnerabili alla neurodegenerazione. L'inibizione delle fosfodiesterasi rappresenta quindi una valida strategia terapeutica per la Corea di Huntington.

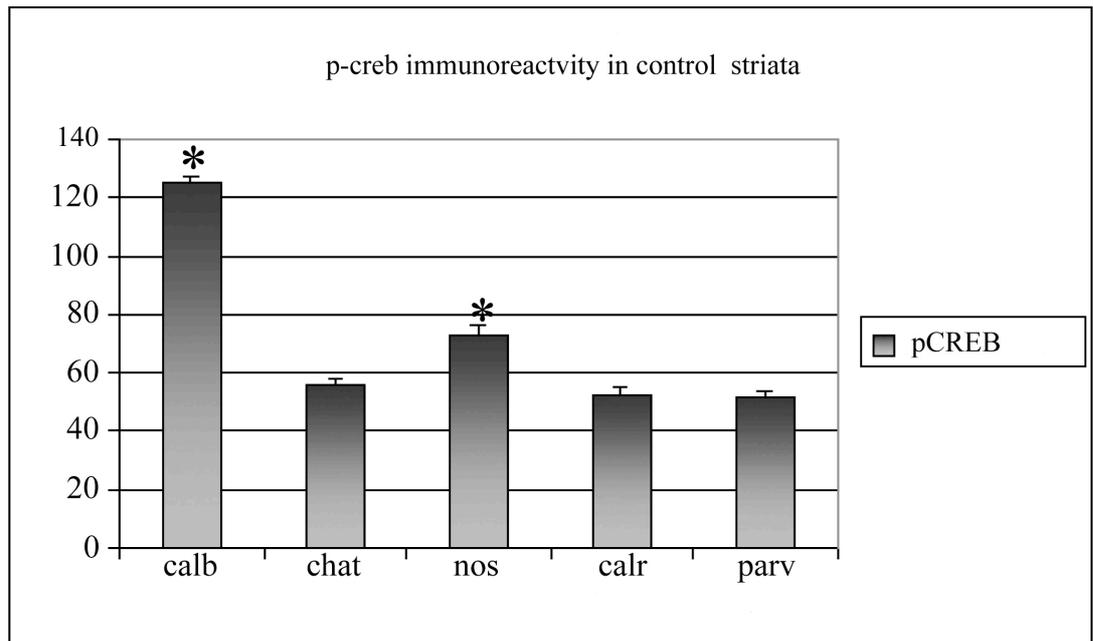


FIG 4.1 L'istogramma mostra i livelli di intensità (espressi in unità arbitrarie) di CREB fosforilata nella popolazione striatale di animali controllo. I livelli di pCREB nei neuroni di proiezioni positivi alla CALB sono più alti rispetto a quelli osservati negli interneuroni.

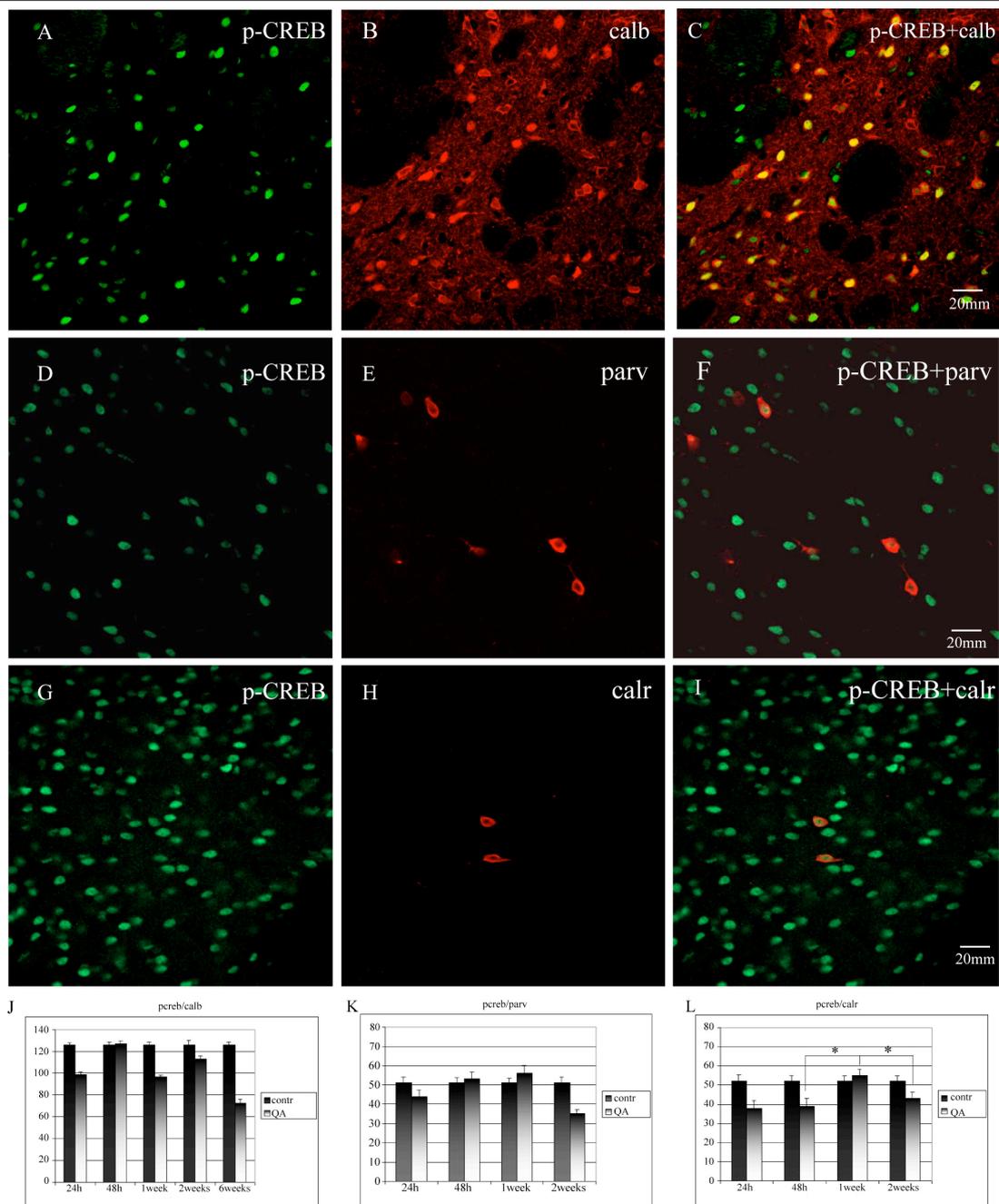


FIG.4.2 Immagini di microscopia confocale relative all'analisi degli esperimenti di doppia immunofluorescenza per la pCREB nei neuroni di proiezione e negli interneuroni parvalbuminergici (PARV) e carletininergici (CARL). (A-B-C) immunolocalizzazione della pCREB nei neuroni CALB. (A) la pCREB è visualizzata in verde mediante marcatura con Cy2, (B) i neuroni CALB positivi sono visualizzati in rosso mediante marcatura con Cy3, (C) immagine merged risultante dalla combinazione di (A) e (B). In (D-E-F) immunostaining della pCREB nei neuroni parvalbuminergici. (D) la pCREB è visualizzata in verde mediante marcatura con Cy2, (E) i neuroni PARV positivi sono visualizzati in rosso mediante marcatura con Cy3, (F) immagine merged risultante dalla combinazione di (D) e (E). (G-H-I) immunostaining della pCREB nei neuroni carletininergici. (G) la pCREB è visualizzata in verde mediante marcatura con Cy2, (H) i neuroni CARL positivi sono visualizzati in rosso mediante marcatura con Cy3, (I) immagine merged risultante dalla combinazione di (H) e (G).

Gli istogrammi mostrano l'intensità della CREB attivata nei neuroni CALB positivi (J), PARV positivi (K) e negli interneuroni CARL positivi di animali controllo e animali lesionati con QA a differenti intervalli di tempo dalla lesione.

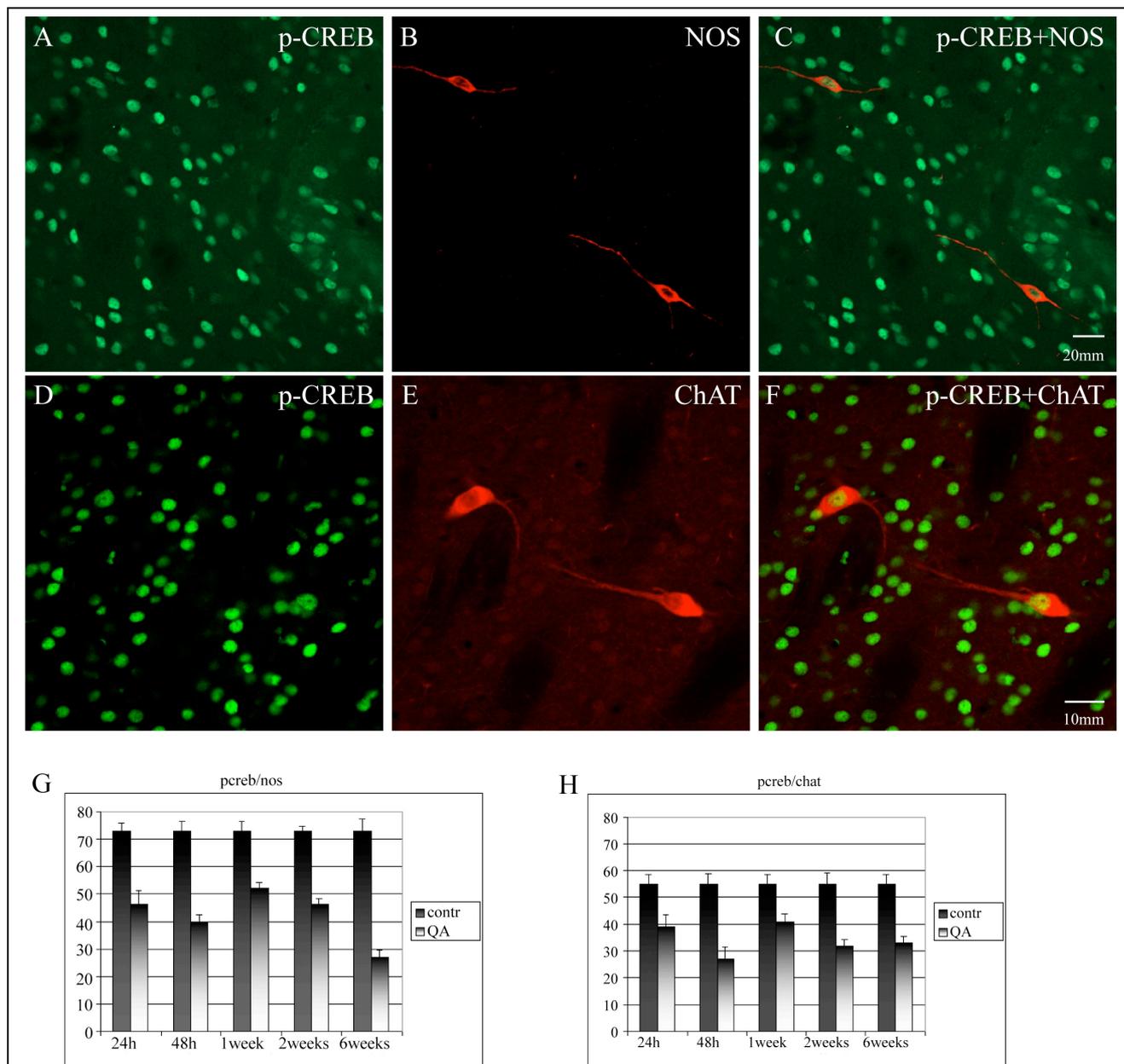
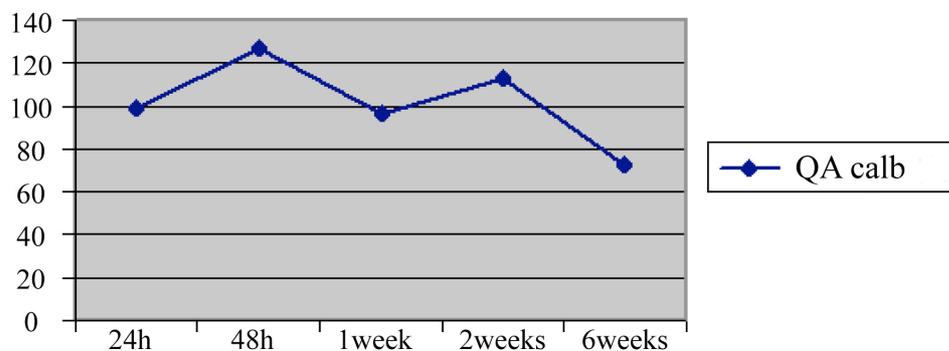


FIG.4.3 Immagini di microscopia confocale relative all'analisi degli esperimenti di doppia immunofluorescenza per la pCREB e i due marcatori di interneuroni striatali NOS e ChAT. In (A-B-C) l'immunostaining della pCREB è comparato con quello della NOS. (A) la pCREB è visualizzata in verde mediante marcatura con Cy2, (B) i neuroni NOS positivi sono visualizzati in rosso mediante marcatura con Cy3, (C) immagine merged risultante dalla combinazione di (A) e (B). In (D-E-F) l'immunostaining della pCREB nei neuroni colinergici (ChAT). (D) la pCREB è visualizzata in verde mediante marcatura con Cy2, (E) i neuroni ChAT positivi sono visualizzati in rosso mediante marcatura con Cy3, (F) immagine merged risultante dalla combinazione di (A) e (B). G-H Gli istogrammi mostrano come varia l'intensità della CREB attivata nei neuroni nitrinergici (G) e colinergici (H) di animali controllo e animali lesionati con QA a differenti intervalli di tempo dalla lesione.

A Intensity of pCREB immunolabeling in CALB+ projection neurons after QA lesion



B Intensity of pCREB immunolabeling in interneurons after QA lesion

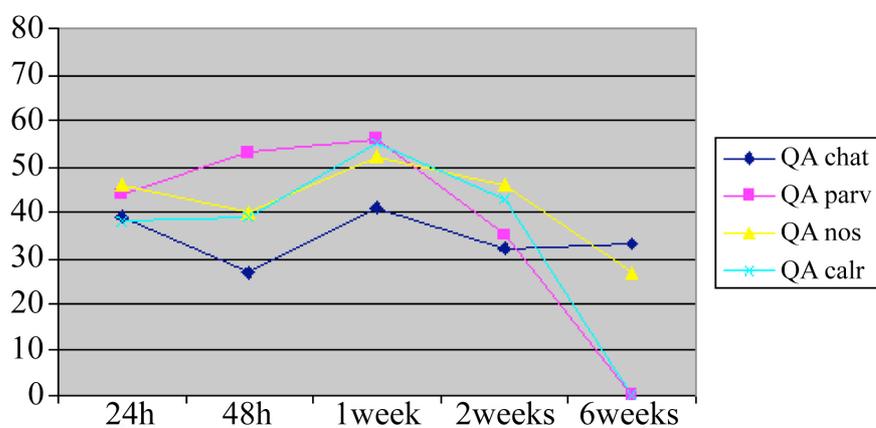


FIG 4.4 Questi grafici riassumono l'andamento temporale dell'attività della CREB nei neuroni di proiezione (A) e nei differenti tipi di interneuroni striatali (B) di animali lesionati con QA. Si può notare che le popolazioni degli interneuroni striatali più resistenti alla patologia, quelli colinergici (ChAT) e quelli somatostatinerigici (NOS), riescono a mantenere i livelli di CREB attivata costanti ai diversi intervalli di tempo dopo la lesione. Al contrario le sottopopolazioni più vulnerabili perdono la pCREB già dopo le 2 settimane dalla lesione.

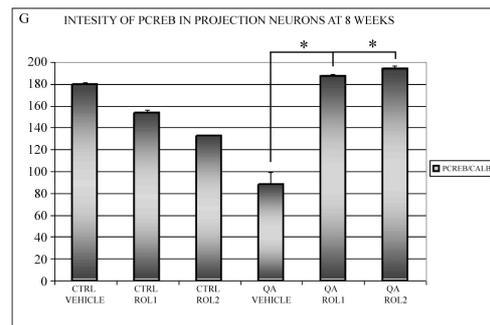
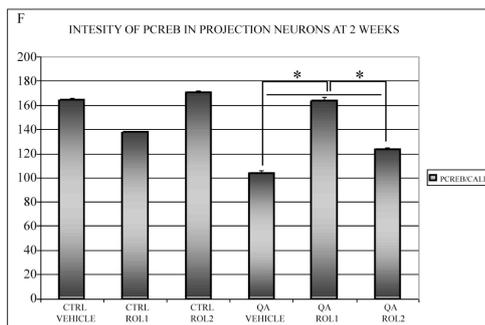
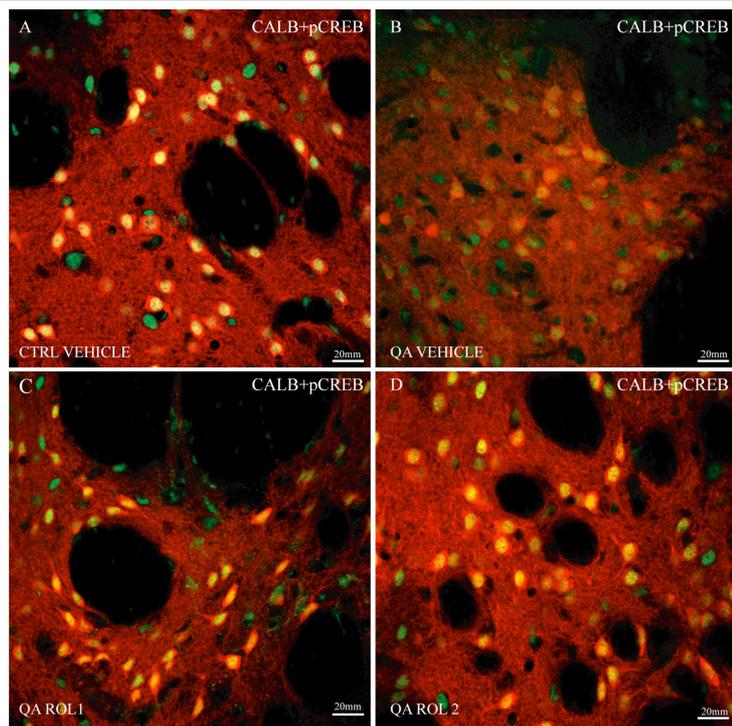


FIG 4.5 (A-B-C-D) Immagini di microscopia confocale relative all'analisi degli esperimenti di doppia immunofluorescenza per la pCREB e i neuroni di proiezione striatale (CALB). La pCREB è visualizzata in verde mediante marcatura con Cy2, i neuroni CALB positivi sono visualizzati in rosso mediante marcatura con Cy3. L'immunofluorescenza è stata eseguita in animali controllo (A), in animali lesionati con QA (B), ed in animali lesionati e trattati con rolipram 1(0,15mg/kg/day) (C) e rolipram 2 (1,5 mg/kg/day) (D). F-G Gli istogrammi mostrano l'andamento temporale dell'intensità della CREB attivata nei neuroni di proiezione striatale di animali controllo, animali lesionati con QA e animali lesionati e trattati con rolipram 1(0,15mg/kg/day) e rolipram 2(1,5 mg/kg/day) dopo 2 settimane (F) e 8 settimane (G) dalla lesione. Si può notare un aumento significativo dei livelli di pCREB negli animali trattati rispetto a quelli lesionati e non trattati ad entrambi gli intervalli di tempo.

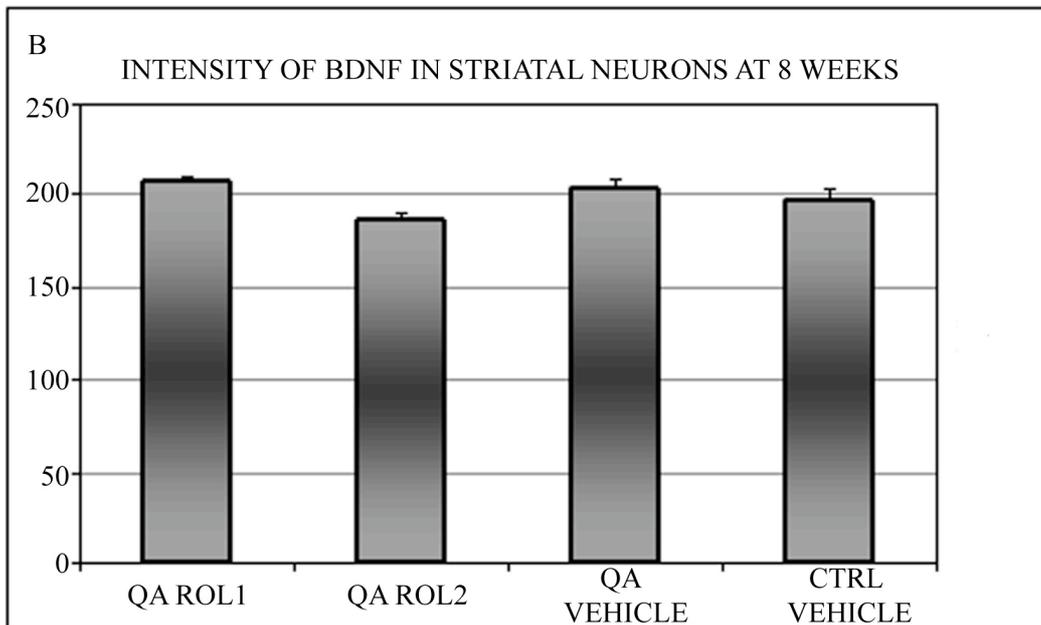
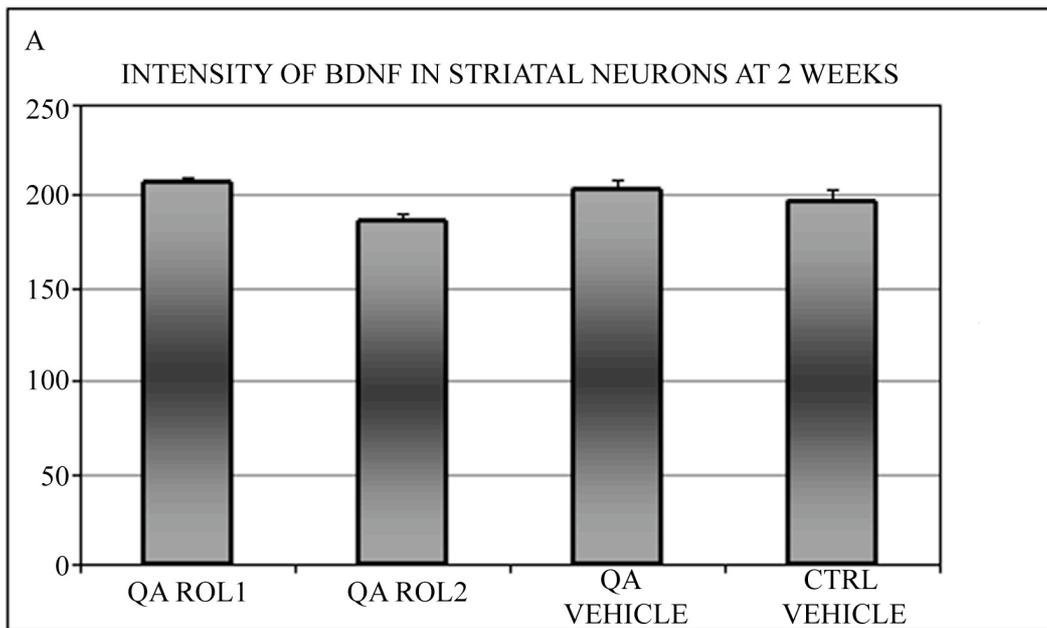


FIG 4.6 Questi grafici mostrano l'intensità del BDNF negli animali controllo, in quelli lesionati con QA, e negli animali trattati con il rolipram alle due concentrazioni , ROL1 (0,15mg/kg/day), ROL 2 (1,5mg/kg/day). (A) Intensità del BDNF 2 settimane dopo la lesione,(B) intensità del BDNF dopo 8 settimane dalla lesione. Si può notare che non vi sono delle differenze significative dei livelli di BDNF prima e dopo il trattamento.

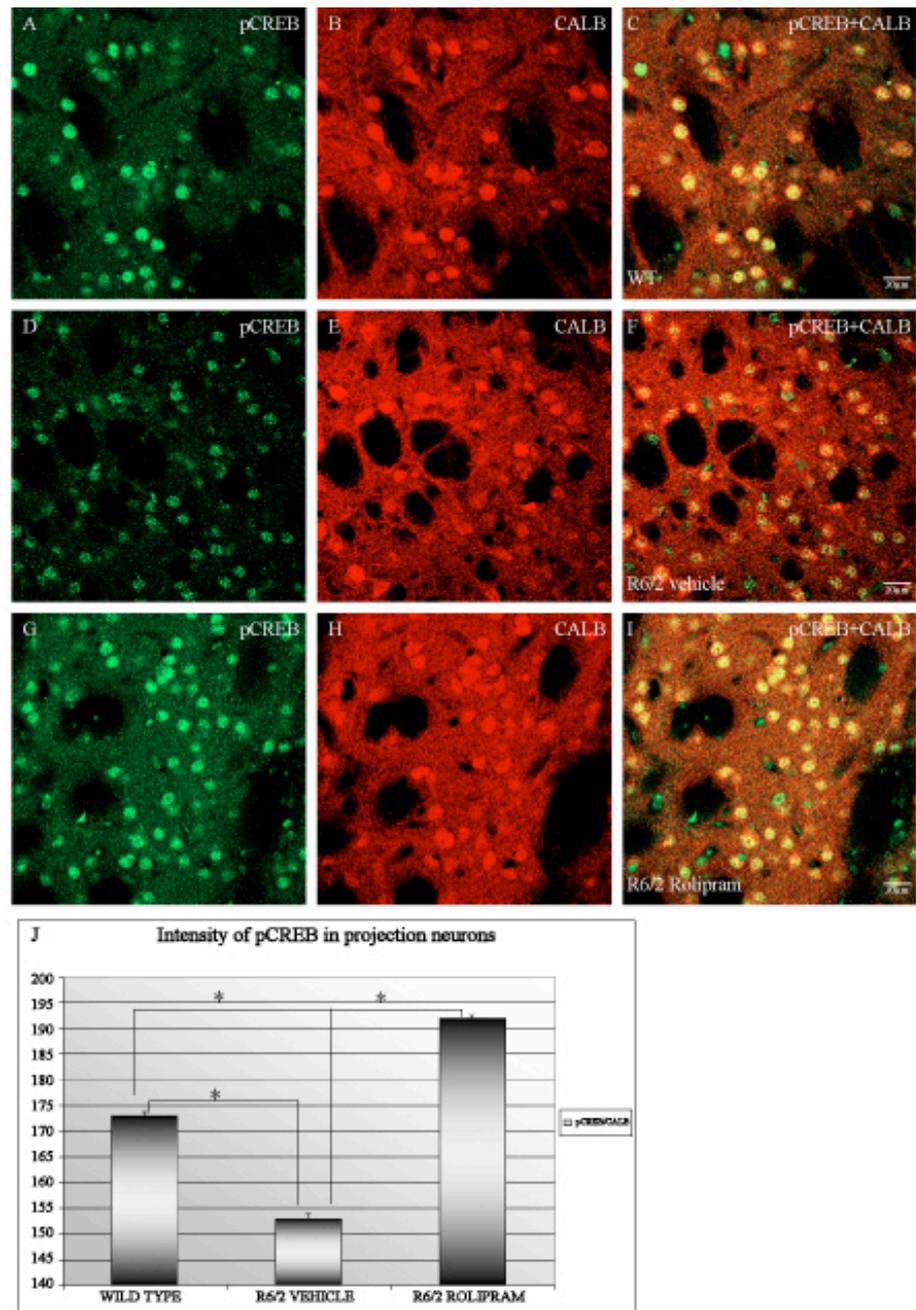


FIG.4.7 Immagini, acquisite al microscopio confocale, di doppia immunofluorescenza per la pCREB e i neuroni di proiezione striatale calbindina positivi (CALB). (A-B-C) Immunofluorescenza della pCREB ( visualizzata in verde mediante marcatura con Cy2) e la CALB (visualizzata in rosso mediante marcatura con Cy3) in topi normali di 12 settimane di età. (D-E-F) Doppia immunofluorescenza per la pCREB e la CALB in striato di topi R6/2 di 12 settimane. (G-H-I) immunofluorescenza della CREB nei neuroni di proiezione striatali di topi R6/2 e trattati con rolipram (1,5 mg/kg/day). (j) L'istogramma descrive l'andamento della CREB fosforilata (espressa n unità arbitrarie) nei neuroni di proiezione di topi normali, topi R6/2 trattati con soluzione fisiologica, e topi R6/2 trattati con rolipram.

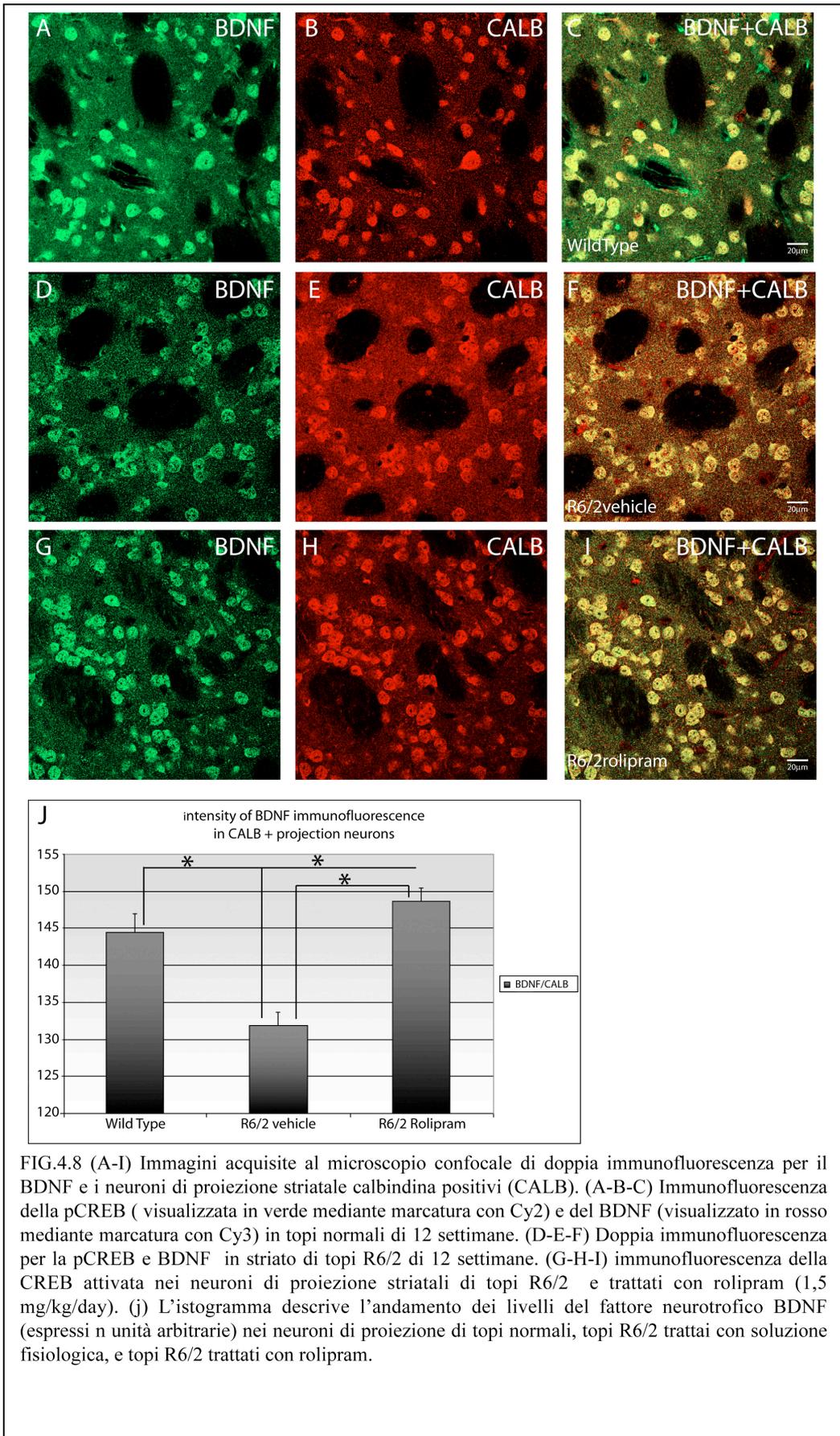


FIG.4.8 (A-I) Immagini acquisite al microscopio confocale di doppia immunofluorescenza per il BDNF e i neuroni di proiezione striatale calbindina positivi (CALB). (A-B-C) Immunofluorescenza della pCREB ( visualizzata in verde mediante marcatura con Cy2) e del BDNF (visualizzato in rosso mediante marcatura con Cy3) in topi normali di 12 settimane. (D-E-F) Doppia immunofluorescenza per la pCREB e BDNF in striato di topi R6/2 di 12 settimane. (G-H-I) immunofluorescenza della CREB attivata nei neuroni di proiezione striatali di topi R6/2 e trattati con rolipram (1,5 mg/kg/day). (j) L'istogramma descrive l'andamento dei livelli del fattore neurotrofico BDNF (espressi n unità arbitrarie) nei neuroni di proiezione di topi normali, topi R6/2 trattati con soluzione fisiologica, e topi R6/2 trattati con rolipram.

## **APPENDICE A - MODELLI ANIMALI DI COREA DI HUNTINGTON**

---

Il reperimento e il trattamento di materiale autoptico umano ha creato per molto tempo ovvie difficoltà nello studio della HD. Nell'ultimo decennio, tuttavia, si è potuta superare questa difficoltà grazie allo sviluppo di modelli cellulari ed animali, che riproducono alcuni aspetti neuropatologici e morfologici della malattia.

I modelli animali, in particolar modo, permettono sia lo studio di cambiamenti morfologici di cellule colpite dalla malattia, sia di saggiare *in vivo* l'effetto di nuovi farmaci, aprendo nuove strade su possibili terapie.

Numerosi sono i modelli prodotti in laboratorio, ma i più utilizzati sono quelli murini.

### **RATTO: MODELLI CHIRURGICI**

#### **MODELLO CHIRURGICO DA LESIONI ECCITOTOSSICHE**

La teoria da eccitotossicità come meccanismo coinvolto nell'HD è emersa negli ultimi decenni dall'osservazione che iniezioni di amminoacidi eccitatori nello striato di ratti e primati portavano alla deplezione neuronale e la fenotipo neurologico tipico dell'HD. I primi studi iniziarono nel 1976 con iniezioni di kainato, un agonista del glutammato non-NMDA (McGeer 1976). Ciò nonostante, non riproduceva perfettamente l'istopatologia che si osservava nell'HD, questo portava a neurodegenerazione dei neuroni di proiezione ma non proteggeva gli internuroni, che invece andavano incontro a morte (K. N. Beal MF 1986)McGeer, 1976; Beal MF, 1986). Al contrario, iniezioni intrastriatali di agonisti del glutammato NMDA-dipendenti, come l'acido chinolinico (QA), erano in grado di dare una degenerazione preferenziale dei neuroni GABAergici con un relativo risparmio degli interneuroni contenenti acetilcolina transferasi(ChAT).

L'eccitotossicità da QA induce morte neuronale mediata da apoptosi(38 vedi review Wang).

Liang e colleghi, dopo attente osservazioni su ratti iniettati con QA, dimostrarono che c'era

una relazione tra la vulnerabilità selettiva dei MSNs e i livelli di espressione di alcune proteine regolatrici dell'apoptosi, quali Bcl-2, p53 e c-Myc (Liang 2005).

Gli agonisti del recettore NMDA come QA danno il pattern più simile alla lesione striatale che avviene nell'HD. La lesione da QA, che è diventato un modello animale ampiamente usato per HD, determina una forte perdita di neuroni di proiezione striatali e un risparmio relativo degli interneuroni ChAT (Schwarcz R 1983) Beal et al., 1986; Qin et al., 1992; Ferrante et al., 1993). I neuroni NADPH invece contengono somatostatina (SOM) e neuropeptide Y (NPY), e entrambi resistono alla lesione da HD e QA (Beal et al., 1986; Qin et al., 1992; Ferrante et al., 1993). L'enkefalina e la sostanza P, che si trovano nei neuroni di proiezione GABAergici, decrementano entrambe in seguito a lesione da QA (Beal et al., 1986; (Qin Y 1992, Ferrante RJ 1993). Gli interneuroni striatali parvalbuminergici che contengono CBP (proteina legante calcio) degenerano in seguito a lesione da QA, mentre gli interneuroni calretinina sono relativamente conservati (Waldvogel HJ 1991, Alexi T 1997). La presenza della calbindina nella maggior parte dei neuroni di proiezione striatali GABAergici non sembra conferire a questi protezione dalla degenerazione striatale dovuta a lesione da QA (Waldvogel et al., 1991; Alexi et al., 1997; Hughes et al., 1999), al contrario dei neuroni calbindina della sostanza nera che sono abbastanza resistenti alla lesione (Lavoie e Parent, 1991; German et al., 1992; Iacopino et al., 1992; Alexi e Hefti, 1996). Come nell'HD, la lesione da QA porta a marcata gliosi, evidente anche un anno dopo la lesione (Bjorklund et al., 1986). Nel modello animale QA è riprodotta la perdita dei recettori GABA<sub>A</sub> nello striato HD post mortem e l'incremento nel globo pallido (Faull et al., 1993). Comunque, anche la sostanza nera, un'altra area target striatale, mostra un incremento dei recettori GABA<sub>A</sub> (Nicholson LF 1995) Quindi, la lesione con QA riproduce molto da vicino la neuropatologia e i cambi di recettore trovati nell'HD. La maggior parte della morte neuronale si osserva nei primi 3 giorni. Questo è stato osservato mediante l'applicazione del TUNEL che marca sia i neuroni apoptotici che quelli necrotici e grazie all'elettroforesi che

permette di fare una distinzione tra i due tipi di neuroni (Nakai M 1999, Portera-Cailliau C 1995). La degenerazione dello striato varia nel tempo fino a raggiungere il massimo decremento a sette giorni dalla lesione (Bazzett TJ 1994). Il QA può produrre iperattività notturna nei ratti, e questo quindi può essere considerato nei roditori, l'equivalente della corea (F. R. Bazzett TJ 1996)(Bazzett et al., 1996).

### **MODELLO DA SOMMINISTRAZIONE INTRAMUSCOLARE DI ACIDO 3 NITROPROPIONICO**

E' stato dimostrato che iniezioni ripetute intramuscolari di acido 3 nitropropionico (3-NP) una tossina mitocondriale capace di attraversare rapidamente la barriera ematoencefalica, in molte specie di ratti, topi e scimmie riproducono il pattern istopatologico tipico dell' HD. Nelle scimmie trattate con 3-NP, si possono osservare dei movimenti spontanei anormali che assomigliano alla discinesia delle braccia e alla distonia delle gambe dei pazienti HD.

Il 3-NP, somministrata in dose adeguata e per un periodo di tempo limitato, è una neurotossina selettiva striatale nei roditori (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 1993). Gli effetti selettivi del 3-NP per alcune regioni del cervello sono probabilmente dovuti all'alto tasso metabolico nelle aree colpite o all'alta espressione di recettori NMDA. E' stato proposto che la neurotossicità selettiva striatale del 3-NP sia causata da un malfunzionamento della barriera ematoencefalica e dalla conseguente emorragia intracerebrale (Nishino et al., 1995; Shimano et al., 1995). Inoltre, è stato osservato, mediante tecniche immunistochemiche, un risparmio di fibre tirosina idrossilasi sia nelle lesioni tipo I, che tipo II e lungo i perimetri delle lesioni di tipo III (Bossi et al., 1993). Molti studi sono stati ampiamente descritti sulla neurodegenerazione associata al 3-NP e sulla sua utilità come modello HD, ma le descrizioni dei sintomi comportamentali prodotti dal 3-NP sono ancora poche.

## MODELLI GENETICI

Da quando è stato scoperto il gene mutato che causa l'HD, un passo importante nella ricerca di questa patologia è stato lo sviluppo di diversi modelli genetici murini che esprimono tale mutazione. Questi modelli animali sono indispensabili perché permettono di poter studiare l'istopatologia e i meccanismi molecolari della patologia anche nelle sue prime fasi (Zuccato C., 2005).

Gli animali transgenici sono utili per l'inserzione di geni con un numero di triplette variabili, che potranno in questo modo esprimere un'htt mutata con un tratto poly-Q di diversa lunghezza. Questi modelli, avendo una vita media relativamente breve, sono indispensabili perché danno l'opportunità di poter testare gli effetti di diversi farmaci in maniera rapida, permettendo di poter fare uno screening in tempi brevi dei diversi composti che se testati nell'uomo richiederebbero molti anni. Sono tre i principali gruppi di ricerca che hanno prodotto modelli transgenici: Mangiarini, Reddy, Hogdson,. Questi differiscono tra loro per il decorso clinico della malattia e per l'età d'insorgenza dei sintomi.

I modelli genetici murini possono essere divisi in: *topi transgenici*, *topi knock-in*, *topi knock-out* e *topi transfettati mediante virus*

## TOPI TRANSGENICI

### TOPI TRANSGENICI CONTENENTI FRAMMENTI DI Htt

Topi appartenenti alle linee transgeniche R6 sono stati prodotti introducendo nella blastocisti di topo, cellule embrionali staminali in precedenza transfettate con un frammento genomico di 2 Kb, contenente il primo esone del gene umano dell'huntingtina con un numero di triplette CAG che varia da 141 a 157(Mangiarini et al., 1996). Sono state stabilizzate sei linee di cui quattro contengono un tratto espanso di triplette CAG superiore a quello associato all'HD e che vengono definiti R6/1 (CAG)<sub>115</sub>, R6/2 (CAG)<sub>145</sub>, R6/5 (CAG)<sub>135-156</sub>,

R6/0 (CAG)<sub>142</sub>; le altre due linee costituiscono controlli che non sviluppano la malattia poiché esprimono l'N-terminale dell'huntingtina con sole 18 glutammine.

I modelli R6/1, R6/2, R6/5, riproducono il fenotipo dell'HD sviluppando le caratteristiche cliniche della malattia, ma differenziandosi l'uno dall'altro per l'età di insorgenza dei sintomi (diversa è la lunghezza del tratto poli-Q espresso in ognuno dei modelli). La linea R6/0 non sviluppa invece alcun sintomo nonostante il numero di triplette CAG ripetute sia patologico (ciò è correlato all'inattivazione del transgene probabilmente a causa del sito d'integrazione).

Nelle due linee più utilizzate la R6/1 ha un'età d'insorgenza attorno al quarto/quinto mese di età, mentre la R6/2 manifesta i primi sintomi dopo 2 mesi. Le caratteristiche cliniche sono state ben definite in queste due linee transgeniche: i disordini motori includono un'andatura irregolare, movimenti stereotipati e la tendenza a retrarre gli arti quando sospesi per la coda ("feet-clasping"). Le disfunzioni motorie, sono simili a quelle dell'HD umana: movimenti di tipo coreico e mancanza di coordinazione, manifestazioni cliniche che peggiorano nel tempo. I topi R6/2 oltre ai sintomi motori, presentano progressiva perdita di peso (fino al 30% in meno rispetto ai controlli) di tono muscolare (Carter RJ 1999), diabete mellito e non sopravvivono oltre le 12 settimane. Anche la massa cerebrale mostra una progressiva diminuzione, a partire dalla sesta settimana postnatale (Davies SW 1997)(Davies et al., 1997). Aggregati simili a quelli osservati del cervello umano (DiFiglia et al., 1997; Becher et al., 1998; Gourkfinckel-An et al., 1998) sono stati identificati per la prima volta sotto forma di inclusi intranucleari (neuronal intranuclear inclusion, NII) nelle linee N-171-82Q (C. Ross 1997, Hersch 2004). Questa scoperta portò per la prima volta ad ipotizzare che la degenerazione e il fenotipo patologico associato alla corea, fosse una conseguenza di una disfunzione delle cellule che esprimevano l'htt mutata e gli aggregati nucleari e citoplasmatici.

Gli NII contengono sia huntingtina che ubiquitina, possono quindi essere localizzati al microscopio ottico con tecniche di immunoistochimica. Nei topi R6/2 appaiono già prima della quarta settimana nella corteccia e nell'ippocampo, mentre solo in casi isolati si riscontrano anche inclusi extranucleari (più frequenti invece nelle linee R6/1 e R6/5) (DiFiglia et al., 1997). Più recentemente sono stati identificati aggregati dendritici; questi sono più piccoli degli NII e sono localizzati soprattutto nella corteccia e nello striato (Li et al., 1999; Meade et al., 2002). Inoltre, NII sono stati identificati anche in altri tessuti: in cellule cardiache, negli epatociti, e nelle isole di Langerhans (Sathasivam et al., 1999).

Un'analisi neuropatologica di sezioni seriate di cervelli di topi R6/2 ha mostrato che a 12 settimane non vi è evidente morte neuronale, ma che a partire dalla quattordicesima settimana sviluppano caratteristiche neurodegenerative soprattutto nella corteccia anteriore, nello striato dorsale e nelle cellule del Purkinje del cervelletto. Altra caratteristica della linea R6/2 è la presenza occasionale di inclusi in astrociti, oligodendrociti e microglia (glial intranuclear inclusions, GII) (Papp MI 1994, Spillantini MG 1998).

### **TOPI TRANSGENICI CHE ESPRIMONO L'INTERO GENE IT15**

In questo modello si ha l'espressione dell'intero gene umano IT15 mutato per l'huntingtina. Sono state prodotte tre linee che si differenziano per la lunghezza del tratto poly-Q. In questi topi la trascrizione del gene è sotto il controllo del promotore del citomegalovirus e dell'enhancer di SV40, così da consentire elevati livelli d'espressione della proteina (Reddy, 1998). Il tratto poliglutamminico varia da 48 a 89 triplette, e le inclusioni sono rare (Goldberg 1996). In questi modelli si è analizzata l'espressione della proteina grazie all'utilizzo di anticorpi diretti contro la porzione N-terminale dell'huntingtina, che è risultata simile a quella dell'huntingtina endogena (Wood et al., 1996).

A livello comportamentale si riscontra una generale iperattività che inizia a 20 settimane e si protrae fino alla 44esima settimana; ma a partire proprio da quest'ultima i topi diventano

meno attivi e meno attenti. Inoltre, negli omozigoti le manifestazioni della malattia si hanno con otto settimane d'anticipo rispetto agli eterozigoti.

Analisi istologiche hanno evidenziato la presenza di degenerazione in prevalenza nello stadio finale della malattia. Si è dimostrata, inoltre, un'astrocitosi reattiva (con anticorpi anti GFAP, proteina espressa nel citoplasma degli astrociti. Si ha perdita dei neuroni della corteccia, e presenza di aggregati (NII e perinucleari) soprattutto in neuroni dello striato e della corteccia cerebrale (Reddy et al., 1998).

### **TOPI KNOCK-IN**

Questi modelli riproducono in maniera fedele la patologia umana. In questo caso si inserisce un frammento con le triplette CAG espanse nell'appropriato genoma murino, e l'espressione del gene è controllato da un promotore endogeno Hdh. Gli omozigoti knock-in sviluppano precocemente cambiamenti comportamentali, ancora prima che si possano evidenziare i cambiamenti neuropatologici. Una caratteristica fondamentale è il lento decorso della patologia, questo permette uno studio più dettagliato dei meccanismi patologici (KirKwood 2001). Il modello knock.in con un numero di triplette di 72-80 mostra un comportamento aggressivo, aggregati di neuropilo, ma non si evidenzia ne gliosi ne morte neuronale (Lin, 2001; Shelbourne, 1999). Quelli con un tratto poliglutamminico formato da 111 ripetizioni sviluppano una neuropatologia selettiva per lo striato, comparsa dell'intera proteina mutata nel nucleo dei neuroni striatali, formazioni di inclusioni N-terminali e conseguente aggregati insolubili. Tuttavia questi topi non mostrano alterazioni del fenotipo comportamentale (Wheeler VC., 2002).

### **TOPI KNOCK-OUT**

Nei topi Knock-out il gene che codifica per l'htt viene bloccato. È stato osservato che i topi omozigoti e knock-out morivano precocemente, quando ancora embrioni. Questo indicava che l'htt aveva un ruolo importante nello sviluppo embrionale. Tuttavia è stato anche dimostrato che l'mhtt può migliorare il fenotipo knock-out indicando in questo modo che

l'effetto della mutazione non è principalmente dovuto ad una perdita di funzione della proteina. (Duyao, 1995 ; Nasir J., 1995; Zeitlin, 1995; White, 1997).

### **MODELLI ANIMALI CON FRAMMENTI POLY-Q INSERITI MEDIANTE VIRUS**

In questi modelli il vettore virale viene utilizzato per inserire il gene intero o parte di esso in punti precisi del genoma murino. Si possono usare due tipi di vettori, l'adenovirus e il lentivirus, entrambi si integrano nel genoma dell'ospite. Questi modelli possono essere usati per studiare gli effetti di discrete quantità di mhtt e gli effetti temporali e spaziali della mutazione in diverse condizioni controllate, rispetto ai topi transgenici o a quelli knock-in. Questo è importante perché animali geneticamente identici e che portano pertanto lo stesso numero di triplette, possono sviluppare un fenotipo e una quantità di aggregati diverse (Senut, 2000; Morley, 2002). Senut et al., hanno studiato gli effetti dell'inserzione di un tratto poly-Q di 97 ripetizioni, inserito mediante adenovirus (AAVV). L'iperespressione di questo tratto portava alla formazione di aggregati nucleari e citoplasmatici subito dopo 5 giorni l'inserzione. Questo dimostrava che l'espressione del solo tratto poly-Q bastava allo sviluppo delle inclusioni.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Albin RL, Young AB, Penney JB. «The functional anatomy of basal ganglia disorders.» *Trends Neurosci*, 1989: 12(10):366-75.
- Alcántara S, Frisén J, del Río JA, Soriano E, Barbacid M, Silos-Santiago I. «TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death.» *J Neurosci.* , 1997: 17(10):3623-33.
- Alexi T, Venero JL, Hefti F. «Protective effects of neurotrophin-4/5 and transforming growth factor-alpha on striatal neuronal phenotypic degeneration after excitotoxic lesioning with quinolinic acid. » *Neuroscience*, 1997: 78:73-86.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ. «Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain.» *Nature.* , 1997 : 23;389(6653):856-60.
- Anderson KA, Means AR. « Defective signaling in a subpopulation of CD4(+) T cells in the absence of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV.» *Mol Cell Biol*, 2002: 22:23-29.
- Andrade, MA., & Bork T. «Heat repeats in the Huntington's disease protein.» *Nature Genet.*, 1995: 11:115-116.
- Ashizawa T. L., Wong J. C., Richards C.S., Caskey C.T. and Jankovic J. «CAG repeat size and clinical presentation in Huntington's disease.» *Neurology*, 1994: 44:1137-1143.
- Baillie GS, Houslay MD. «Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes.» *Curr Opin Cell Biol.* , 2005 : 17(2):129-34.
- Bannister, AJ., Kouzarides T. «The CBP co-activator is a histone acetyltransferase.» *Nature*, 1996: 384: 641-643.
- Bao, J., Sharp A.H., Wagster M.V., Becher M., Schilling G., Ross C.A., Dawson V.L., and Dawson T.M. «Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interaction involving calmodulin.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996: 93:5037-5042.
- Baquet, Z.C., Gorski, J.A. & Jones K.R. «Early striatal dendrite deficits followed by neurons loss with advanced age in the absence of anterograde cortical-brain-derived neurotrophic factor.» *J. Neurosci.*, 2004: 24: 4250-4258.
- Barad M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H, Kandel E. «Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory.» *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 1998: 95(25):15020-5.
- Bazzett TJ, Becker JB, Falik RC, Albin RL. «Neuroscience » *Chronic intrastratial quinolinic acid produces reversible changes in perikaryal calbindin and parvalbumin immunoreactivity.* , 1994: 60:837-841.
- Bazzett TJ, Falik RC, Becker JB, Albin RL. «Synergistic effects of chronic exposure to subthreshold concentrations of quinolinic acid and malonate in the rat striatum. » *Brain Res*, 1996: 718:228-232.

- Beal MF, Brouillet E, Jenkins B, Henshaw R, Rosen B, Hyman BT. «Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate.» *J. Neurochem.*, 1993: 61(3):1147-50.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. «Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid.» *Nature*, 1986: 321:168-171.
- Beal, MF. «Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness?» *Ann. Neurol.*, 1992: 31: 119-130.
- Becher MW, Kotzuk JA, Sharp AH, Davies SW, Bates GP, Price DL, Ross CA. «Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. » *Neurobiol Dis*, 1998: 4:387-397.
- Bemelmans AP, Horellou P, Pradier L, Brunet I, Colin P, Mallet J. «Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer.» *Hum Gene Ther.*, 1999: 2987-97.
- Block F, Loos M, Frohn C, Schwarz M. «Association between inflammation and nigral neuronal damage following striatal excitotoxic lesion.» *Brain Res*, 2004: 998:29-35.
- Block F, Tondar A, Schmidt W, Schwarz M. «Delayed treatment with rolipram protects against neuronal damage following global ischemia in rats. » *Neuroreport*, 1997: 8:3829-3832.
- Brandt J. F., Bylsma F.M., Gross R., Stine O.C., Ranen N. and Ross C.A. «Trinucleotide repeat length and clinical progression in Huntington's disease.» *Neurology*, 1996: 46:527-531.
- Burke, JR., Enghild JJ., Martin ME., Jou YS., Myers RM., Roses AD., Vance MJ., and Strittmatter WJ. «Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GPH.» *Nature Med.*, 1996: 2:347-349.
- Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Sanchez A, Mestre L, Valenti M, Garcia-Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz J. «Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/orvanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. » *Neurobiol Dis*, 2005: 20:207-217.
- Calabresi P, Centonze D, Bernardi G. «Cellular factors controlling neuronal vulnerability in the brain: a lesson from the striatum.» *Neurology.*, 2000 : 55(9):1249-55.
- Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ. «Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation.» *J Neurosci*, 1999: 19:3248-3257.
- Cattaneo, et al. «Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research.» *Trends Neurosci.*, 2001 : 24:182-188.
- Cepeda C, Starling AJ, Wu N, Nguyen OK, Uzgil B, Soda T, André VM, Ariano MA, Levine MS. «Increased GABAergic function in mouse models of Huntington's disease: reversal by BDNF.» *J Neurosci Res.*, 2004 : 78(6):855-67.

- Cherry JA, Davis RL. «Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. » *J Comp Neurol*, 1999: 407:287-301.
- Chiang MC, Lee YC, Huang CL, Chern Y. «cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues.» *J Biol Chem.*, 2005 : 280(14):14331-40.
- Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M. «Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release.» *Hum Mol Genet.* , 2004: 13(14):1407-20.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. «Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP.» *Nature*, 1993: 365:855-859.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. « Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport.» *J Neurosci* , 1997: 17:2295-2313.
- Cooper, JK, Schilling G, Peters MF, Herring WJ, Sharp AH, Kaminsky Z, Masone J, Khan FA, Delanoy M, Borchelt DR, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. «Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. » *Hum Mol Genet* , 1998: 7:783-790.
- Coyle JT, Schwarcz R. «Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. » *Nature* , 1976: 263:244-246.
- Coyle, J.T. and Puttfarcken P. «Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders.» *Science*, 1993: 262:689-695.
- Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R, Kandel ER. « cAMP response element-binding protein is activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991: 88:5061-5065.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP. «Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation.» *Cell*, 1997: 90:537-548.
- Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. «The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. » *J Neurosci* , 2000: 20:4563-4572.
- Dawson TM, Ginty DD. « CREB family transcription factors inhibit neuronal suicide. » *Nat Med*, 2002: 8:450-451.
- DeMarch Z, Giampa C, Patassini S, Martorana A, Bernardi G, Fusco FR. « Beneficial effects of rolipram in a quinolinic acid model of striatal excitotoxicity. » *Neurobiol Dis*, 2007: 25:266-273.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N. «Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. » *Science*, 1997: 277:1990-1993.

- Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME. « Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. » *Science*, 2001: 294:333-339.
- Dragatis, I., Levine M.S., Zetlin S. «Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice.» *Nat. Genet.*, 2000: 26:300-306.
- Dragunow M, Faull RL, Lawlor P, Beilharz EJ, Singleton K, Walker EB, Mee E. «In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes.» *Neuroreport.* , 1995: 6(7):1053-7.
- Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novoletto A, Persichetti F, Frontali M, folstein S, Ross C, Franz M, Abott M. «trinucleotide repeat length instability and age of onset in huntington's disease.» *Nat. Genet*, 1993: 4:387-392.
- Duyao, MP., Aurebach AB., Ryan A., Persichetti F., Barns GT., McNeil SM., et al. «Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh.» *Sciece*, 1995 : 269: 407-10.
- Evert BO, Wullner U, Klockgether T. «Cell death in polyglutamine diseases. » *Cell Tissue Res* , 2000: 301:189-204.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E, Beal MF. « Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. » *Exp Neurol*, 1993: 119:46-71.
- Ferrante RJ., Lee J., Ryu H., Beesen A., et al. «Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice.» *F. Neurosci.*, 2003: 23:9418-27.
- Ferreri K, Gill G, Montminy M. « The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994: 91:1210-1213.
- Freeland K, Boxer LM, Latchman DS. « The cyclic AMP response element in the Bcl-2 promoter confers inducibility by hypoxia in neuronal cells. » *Brain Res Mol Brain Res*, 2001: 92:98-106.
- Fujimaki K, Morinobu S, Duman RS. «Administration of a cAMP phosphodiesterase 4 inhibitor enhances antidepressant-induction of BDNF mRNA in rat hippocampus. » *Neuropsychopharmacology* , 2000: 22:42-51.
- Fusco FR, Chen Q, Lamoreaux WJ, Figueredo-Cardenas G, Jiao Y, Coffman JA, Surmeier DJ, Honig MG, Carlock LR, Reiner A. «Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease.» *J Neurosci* , 1999: 19:1189-1202.
- Fusco FR, Zuccato C, Tartari M, Martorana A, De March Z, Giampa C, Cattaneo E, Bernardi G. «Co-localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain.» *Eur J Neurosci*, 2003: 18:1093-1102.
- Gafni, et al. «Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragment in the nucleus.» *J. Biol. Chem.*, 2004: 279:20211-20220.

- Gafni, J. & Ellerby, LM. «Calpain activation in Huntington's disease.» *J. Neurosci.*, 2002: 22:4842-4849.
- Gardian, G., Browen S., Choi DK., Klivenyi P., Gregorio J., et al. «Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease.» *F.Biol.Chem.*, 2005: 280:556-63.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F. «Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules.» *Cell*, 2004 : 118(1):127-38.
- Giampa C, DeMarch Z, D'Angelo V, Morello M, Martorana A, Sancesario G, Bernardi G, Fusco FR. «Striatal modulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) after excitotoxic lesions: implications with neuronal vulnerability in Huntington's disease. » *Eur J Neurosci*, 2006: 23:11-20.
- Gines S, Seong IS, Fossale E, Ivanova E, Trettel F, Gusella JF, Wheeler VC, Persichetti F, MacDonald ME. «Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice.» *Hum Mol Genet* , 2003: 12:497-508.
- Goehler, H et al. «A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease.» *Mol.Cell.*, 2004: 15:853-865.
- Goldberg, YP., Kalchman MA., Metzler M., Nasir J., Zeisler J., Graham et al.,. «Absence of disease phenotype and intergenerational stability of the CAG repeat in transgenic mice expressing the human Huntington disease transcript.» *Hum. Mol. Genet.*, 1996: 5: 177-85.
- Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M, Arancio O. «Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. » *J Clin Invest* , 2004: 114:1624-1634.
- Gonzalez GA, Montminy MR. « Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. » *Cell* , 1989: 59:675-680.
- Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W, 3rd, Vale WW, Montminy MR. *Nature* , 1989: 337:749-752.
- Gourfinkel-An, Cancel, G., Trottier Y., Devys D., Tora L., Lutz Y., Imbert G., Saudou F., Stevanin G., Agid Y., Brice A., Mandel J.L., and Hirsch E.C. «Differential distribution of the normal and mutated forms of huntingtin in the human brain.» *Ann. Neurol.*, 1997: 42:712-719.
- Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Bertram L, Murphy Z, Warby SC, Doty CN, Roy S, Wellington CL, Leavitt BR, Raymond LA, Nicholson DW, Hayden MR. «Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin.» *Cell.* , 2006: 125(6):1179-91.
- Greene, JC., and Greenamyre J.T. «Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate.» *J. Neurochem.*, 1995: 64:430436.
- Gunawardena S, Goldstein LS. «Cargo-carrying motor vehicles on the neuronal highway: transport pathways and neurodegenerative disease.» *J Neurobiol.* , 2004: 58(2):258-71.

- Gunawardena S, Her LS, Bruschi RG, Laymon RA, Niesman IR, Gordesky-Gold B, Sintasath L, Bonini NM, Goldstein LS. «Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*.» *Neuron*. , 2003: 40(1):25-40.
- Gusella J.F., MacDonald M.E., Ambrose C.M. and Duyao M.P. «Molecular genetics of Huntington's disease.» *Arch.Neurol.*, 1993: 50:1157-1163.
- Gusella, J.F., Wexler,N.S., Conneally P.M., Naylor S.L., Anderson M.A., Tanzi R.E., Watkins P.C., Ottima K., Wallace M.R., Sakaguchi A.Y., Young A.b., Shoulsen I., Bonilla E. and Martin J.B. «A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease.» *nature*, 1983: 306:234-238.
- Gutkunst CA, Li SH, Yi H, Ferrante RJ, Li XJ, Hersch SM. «The cellular and subcellular localization of huntingtin-associated protein 1 (HAP1): comparison with huntingtin in rat and human.» *J.Neurosci.* , 1998: 18(19):7674-86.
- Gutkunst C.A., Levery AL, Heilman CJ, Whaley WL, Yi H., Nash N.R., Rees H.D., Madden J.J., Hersch S.M. «Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-huntingtin protein antibodies.» *Proc.Natl .Acad. Sci. USA*, 1995: 92:8710-8714.
- Hackam AS, Singaraja R, Wellington CL, Metzler M, McCutcheon K, Zhang T, Kalchman M, Hayden MR. « The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity.» *J Cell Biol* , 1998: 141:1097-1105.
- Hagiwara M, Alberts A, Brindle P, Meinkoth J, Feramisco J, Deng T, Karin M, Shenolikar S, Montminy M. « Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. » *Cell* , 1992: 70:105-113.
- Haries, P & Wanker, EE. «The hunt for huntingtin function:interaction partners tell many different stories.» *Trends Biochem. Sci.*, 2003: 28:425-433.
- Harper PS, Jones L. "Huntington disease: genetic and molecular studies." *new York:Oxford university press*, 2002: 113-158.
- Hebb AL, Robertson HA, Denovan-Wright EM. « Striatal phosphodiesterase mRNA and protein levels are reduced in Huntington's disease transgenic mice prior to the onset of motor symptoms.» *Neuroscience* , 2004: 123:967-981.
- Hersch, SM., Ferrante RJ.,. «Translating therapies for Huntington's disease from genetic animal models to clinical trials.» *NeuroRx*, 2004: 3: 298-603.
- Ho LW, Carmichael J, Swartz J, Wyttenbach A, Rankin J, Rubinsztein DC. «The molecular biology of Huntington's disease.» *Psychol Med* , 2001: 31:3-14.
- Ho N, Liauw JA, Blaeser F, Wei F, Hanissian S, Muglia LM, Wozniak DF, Nardi A, Arvin KL, Holtzman DM, Linden DJ, Zhuo M, Muglia LJ, Chatila TA. «Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-depe.» 2000.
- Ho, N, Liauw JA, Blaeser F, Wei F, Hanissian S, Muglia LM, Wozniak DF, Nardi A, Arvin KL, Holtzman DM, Linden DJ, Zhuo M, Muglia LJ, Chatila TA. «Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type IV/Gr-deficient mice.» *J Neurosci*, 2000: 20:6459-6472.

- Hodgson, JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR. « A YAC mouse model for Huntington's disease with full length mutant huntingtin. cytoplasmic toxicity and selective striatal neurodegeneration.» *Neuron*, 1999: 23:181-192.
- Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. «Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA.» *Science*, 1988: 242:1430-1433.
- Hoogeveen, AT., Willemsen R., Meyer, N., de Rooij, K.E., Roos R.A., van Ommen, G.J., and Galjaard H. «Characterization and localization of the Huntington's disease gene product.» *Hum. Mol. Genet.*, 1993: 2:2069-2073.
- Hosoi R, Ishikawa M, Kobayashi K, Gee A, Yamaguchi M, Inoue O. «Effect of rolipram on muscarinic acetylcholine receptor binding in the intact mouse brain. » *J Neural Transm*, 2003: 110:363-372. .
- Houslay MD, Adams DR. «PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization.» *Biochem J* , 2003: 370(Pt 1):1-18.
- Houslay MD, Schafer P, Zhang KY. «Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target.» *Drug Discov Today*., 2005 : 10(22):1503-19.
- Huang CC., Faber PW., Persichetti F., Mittal V., Vonsattel JP., MacDonald ME., Gusella JF. «Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins.» *Somat. cell Mol. Genet.*, 1998: 24:217-233.
- Huges, RE. «Polyglutamine disease: acetyltransferases awry.» *Curr. Biol.*, 2002: 12:R141-43.
- Huntington's disease Collaborative research group. «A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease.» *cell*, 1993: 72:971-983.
- Iannicola C, Moreno S, Oliverio S, Nardacci R, Ciofi-Luzzatto A, Piacentini M. «Early alterations in gene expression and cell morphology in a mouse model of Huntington's disease.» *J Neurochem.* , 2000 : 75(2):830-9.
- Itoh T, Tokumura M, Abe K. « Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding activity and BDNF level in learned helplessness rats. » *Eur J Pharmacol* , 2004: 498:135-142.
- Jackson M, Gentleman S, Lennox G, Ward L, Gray T, Randall K, Morrell K, Lowe J. «The cortical neuritic pathology of Huntington's disease.» *Neuropathol Appl Neurobiol* , 1995: 21:18-26.
- Jacob C, Szilagy C, Allen JM, Bertrand C, Lagente V. «Role of PDE4 in superoxide anion generation through p44/42MAPK regulation: a cAMP and a PKA-independent mechanism. » *Br J Pharmacol* , 2004: 143:257-268.
- JD, Sweatt. «The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. » *J Neurochem*, 2001: 76:1-10.

- Jiang H., Poirier MA., Liang Y., pei Z., weiskittel CE., Smith W., DeFranco D., Ross CA. «Depletion of CBP is directly linked with cellular toxicity caused by mutant huntingtin.» *Neurobiology disease*, 2006: 23:543-551.
- Jovanovic, J.N., Czernik, A.J., Fienberg. A.A., Greengard P & Sihra T.S. «Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release.» *Nature Neurosci.*, 2000: 3:323-329.
- Kahlem, P., Green H and Dijan P. «Transglutaminase action imitates Huntington's disease: selective polymerization of huntingtin containing expanded polyglutamine. » *Mol. Cell*, 1998: 1:595-601.
- Kang H, Sun LD, Atkins CM, Soderling TR, Wilson MA, Tonegawa S. «An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. » *Cell*, 2001: 106:771-783.
- Kazantsev A, Preisinger E, Dranovsky A, Goldgaber D, Housman D. «Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells.» *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 1999 : 96(20):11404-9.
- Kim, Y.J.et al. «Caspase-3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brain, associate with membranes and undergo calpain-dependent proteolysis.» *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001: 98:12784-12789.
- Kirkwood, SC., Su JL., Wu Y., Olivieri M., Li XJ., Li et al. «Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease.» *Arch Neurol.*, 2001: 58: 273-8.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. « Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. » *Nature* , 1994: 370:223-226.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. « Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB.» *Nature* , 1994: 370:223-226.
- Kwok, RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. «Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB.» *Nature*, 1994: 370:223-226.
- Lee HT, Chang YC, Wang LY, Wang ST, Huang CC, Ho CJ. « cAMP response element-binding protein activation in ligation preconditioning in neonatal brain. » *Ann Neurol*, 2004: 56:611-623.
- Li, H. & Li, XJ. «Huntingtin-protein interaction and the pathogenesis of Huntington's disease.» *Trends Genet.*, 2004: 20:146-154.
- Li, SH., e Li XJ. «Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease.» *Trends Genet.*, 2004: 20:146-154.
- Liang, ZQ., Wang XX., Wang YM., Chuang DW., DiFiglia M., Thomas N. «Susceptibility of striatal neurons to excitotoxic injury correlates with basal levels of Bcl-2 and the induction of P53 and c-Myc immunoreactivity.» *Neurobiol Disease*, 2005: 20: 562-73.

- Lin, CH., Tallaksen-Greene S., Chien WM., Cearley JA., Jackson WS., Crouse et al. «Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease.» *Hum. Mol. Genet.*, 2001: 10:137-144.
- Lonze BE, Ginty DD. «Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system.» *Neuron* , 2002: 35:605-623.
- Luthi-Carter, R., Hanson SA., Strand AD., Bergstron DA., Chun W., Peters NL., Woods AM., Chan EY., Kooperberg C., Krainic D., Young AB., Tapscott SJ., Olson JM. «Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel change in muscle and brain.» *Hum. Mol. Genet.*, 2002: 11:1911-1926.
- Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, Takasawa K, Ohtsuki T, Xia Z, Storm D, Yanagihara T, Hori M, Matsumoto M. «Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo.» *J Neurosci* , 2001: 21:9204-9213.
- Mabuchi, T, Kitagawa K, Kuwabara K, Takasawa K, Ohtsuki T, Xia Z, Storm D, Yanagihara T, Hori M, Matsumoto M. «Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo.» *J Neurosci*, (2001): 21:9204-9213.
- MaCampbell, A., Taye AA., Whitty L., Penney E., Steffan JS., Fischbeek KH. «Histone deacetylase inhibitor reduce polyglutamine toxicity.» *Proc. Natl: Acad. Sci. USA*, 2001: 98: 15179-1584.
- MacDonald, ME. «Huntingtin :alive and well and working in middle managment. .» *Sci.STKE.*, 2003: 207:pe48.
- MacMillan, M.E. and Quarrell O. « The Neurobiology of Huntington's disease. In Huntington's Disease(Harper P., Eds.)» *Saunders, The University Press, Cambridge*, 1996: 317-358.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP. «Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice.» *Cell* , 1996: 87:493-506.
- Mantamadiotis, T., Lemberger T., Bleckmann SC., Kern H., Kretz O., Martin Villalba A., Tronche F., Kellendonk C., Gau D., Kapfhammer J., Otto C., Schmid W., Schutz G. «Distruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration.» *Nat. Genet.*, 2002: 31:47-54.
- Marcora, E., Gowan, K & Lee JE. «Stimulation of neuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated protein HAP1 and MLK2.» *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 2003: 100:9578-9583.
- McC Campbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH. « CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. .» *Hum Mol Genet* , 2000: 9:2197-2202.
- McGeer PL, McGeer EG. «Intracerebral injections of kainic acid and tetanus toxin: possible models for the signs of chorea and dystonia. .» *Adv Neurol*, 1978: 21:331-338.
- McGeer, EG., McGeer PL. «Duolication of bio-chemical chenges of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acid.» *Nature*, 1976: 263: 517-9.

- Meade CA, Deng YP, Fusco FR, Del Mar N, Hersch S, Goldowitz D, Reiner A. «Cellular localization and development of neuronal intranuclear inclusions in striatal and cortical neurons in R6/2 transgenic mice.» *J Comp Neurol*, 2002: 449:241-269.
- Meade, CA, Deng YP, Fusco FR, Del Mar N, Hersch S, Goldowitz D, Reiner A. «Cellular localization and development of neuronal intranuclear inclusions in striatal and cortical neurons in R6/2 transgenic mice.» *J Comp Neurol*, 2002: 449:241-269.
- Minamiyama, M., Katsuno m., Adachi H., Waza M., Sang C., et al. «Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model pf spinal and bulbar muscular atrophy.» *Hum.Mol.Genet.*, 2004: 13: 1183-92.
- Monnet FP. «Transcription and beurotrophic factors in affective disorders: new trends in understanding the action of antidepressant drugs.» *Curr.Psychiatry*, 2005: 1:313-317.
- Monti B, Berteotti C, Contestabile A. «Subchronic rolipram delivery activates hippocampal CREB and arc, enhances retention and slows down extinction of conditioned fear.» *Neuropsychopharmacology.* , 2006: 31(2):278-86.
- Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK. «Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. » *Trends Neurosci*, 1990: 13:184-188.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. « Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure.» *Science*, 1987: 237:192-197.
- Morgan JI, Curran T. «Role of ion flux in the control of c-fos expression.» *Nature* , 1986: 322:552-555.
- Morley, JF., Bringnull HR., Weyers JJ., Morimoto RI. «The threshold for polyglutamine-expansion prootein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*.» *Proc. Natl. cad. Sci. USA* , 2002: 99:10417-22.
- Nagakura A, Niimura M, Takeo S. «Effects of a phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on microsphere embolism-induced defects in memory function and cerebral cyclic AMP signal transduction system in rats. » *Br J Pharmacol*, 2002: 135:1783-1793.
- Nakai M, Qin ZH, Wang Y, Chase TN. «Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolinic acid-induced NF-kappaB activation and apoptosis in rat striatum.» *Brain Res Mol Brain Res*, 1999: 64:59-68.
- Nasir J., Floresco SB., O'Kusky R., Diewert VM., Richman JM., Zeisler J, et al. «Target dstruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterizygothes. » *Cell*, 1995: 81:811-23.
- Nestler EJ. «Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction.» *Nat Rev Neurosci.*, 2001: 2(2):119-28.
- Neuwald, A.F. & Hirano T. «Heat repeats associated with condensins, cohesins and other complexes involved in chromosome-related functions.» *Genome Res.*, 2000: 10:1445-1452.
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. «Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. » *J Neurosci* , 1996: 16:2365-2372.

- Nicholson LF, Faull RL, Waldvogel HJ, Dragunow M. «GABA and GABA<sub>A</sub> receptor changes in the substantia nigra of the rat following quinolinic acid lesions in the striatum closely resemble Huntington's disease.» *Neuroscience*, 1995: 66:507-521.
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. «Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced.» *Brain Res.* , 1988: 451(1-2):205-12.
- Nucifora FC, Jr., Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. «Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity.» *Science*, 2001: 291:2423-2428.
- O'Donnell JM, Zhang HT. «Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4).» *Trends Pharmacol Sci.* , 2004: 25(3):158-63.
- Oerez-Navarro, E., Gavaldà, N., Gratacos, E. & Alberch, J. «Brain-derived neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum.» *J.Neurochem.*, 2005: 92: 678-691.
- Ona, V.O. et al. «Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease.» *Nature*, 1999: 399:263-267.
- Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT. «Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines.» *Nat Neurosci.* , 2002: 5(8):731-6.
- Papp MI, Lantos PL. «The distribution of oligodendroglial inclusions in multiple system atrophy and its relevance to clinical symptomatology. » *Brain*, 1994: 117 ( Pt 2):235-243.
- Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy MR. «Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism.» *Mol Cell Biol* , 1996: 16:694-703.
- Patapoutian A, Reichardt LF. « Trk receptors: mediators of neurotrophin action. » *Curr Opin Neurobiol* , 2001: 11:272-280.
- Pham TA, Impey S, Storm DR, Stryker MP. «CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. » *Neuron*, 1999: 22:63-72.
- Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE. « Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models.» *J Neurosci* , 1995: 15:3775-3787.
- Poser S, Storm DR. «Role of Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. » *Int J Dev Neurosci* , 2001: 19:387-394.
- Qin Y, Soghomonian JJ, Chesselet MF. « Effects of quinolinic acid on messenger RNAs encoding somatostatin and glutamic acid decarboxylases in the striatum of adult rats. » *Exp Neurol* , 1992: 115:200-211.
- Quinn N, Schrag A. «Huntington's disease and other choreas. » *J Neurol* , 1998: 245:709-716.

- Radhakrishnan I, Perez-Alvarado GC, Parker D, Dyson HJ, Montminy MR, Wright PE. «Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions.» *Cell* , 1997: 91:741-752.
- Reddy PH, Williams M, Charles V, Garrett L, Pike-Buchanan L, Whetsell WO Jr, Miller G, Tagle DA. «Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA.» *Nat Genet.* , 1998 : 20(2):198-202.
- Ribar TJ, Rodriguiz RM, Khiroug L, Wetsel WC, Augustine GJ, Means AR. «Cerebellar defects in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase IV-deficient mice.» *J Neurosci* , 2000: 20:RC107.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD. « Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. » *Science* , 1999: 286:2358-2361.
- Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E. « Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. » *J Neurosci* , 2000: 20:3705-371.
- Robbins, AR., Ward RD., and Oliver C. «A mutation in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells.» *J. Cell. Biol.*, 1995: 130:1093-1104.
- Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratick C, Sweatt JD. «The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus.» *J Neurosci*, 1999: 19:4337-4348.
- Rose GM, Hopper A, De Vivo M, Tehim A. «Phosphodiesterase inhibitors for cognitive enhancement.» *Curr Pharm Des.*, 2005: 11(26):3329-34.
- Ross, CA. «Intranuclear neuronal inclusion:a common pathogenic mechnism for glutamine-repeat neurodegenerative disease?» *Neuron*, 1997: 19: 147-50.
- Ross, RAC. "Neuropathology of Huntington's chorea. In:Vinken P.J., Klawans H.L., eds Extrapiramidal disorder." *Amsterdam:Elsevier Science*, 1986: 315-326(Handbook of Clinical Neurology, Vol 5).
- Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hammerling GJ, Arnold B, Schutz G. «Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. » *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998: 95:4481-4486.
- Sánchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J. «Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats.» *Neuron.* , 1999: 22(3):623-33.
- Sapp, E., Schwarz,C., Chase, K., Bhide, P.G., Young A.B., Penney J., Vonsattel J.P., Aronin N., and DiFiglia. «Huntingtin localization in brains of normal and Hunitgton's disease patients.» *Ann. Neurology*, 1997: 42:604-612.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME. « Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. » *Cell* , 1998: 95:55-66.
- Schwarcz R, Kohler C. « Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. » *Neurosci Lett*, 1983: 38:85-90.

- Seaton TA, Cooper JM, Schapira AH. «Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors.» *Brain Res.*, 1997: 777(1-2):110-8.
- Senut, MC., Suhr ST., Kaspar B., Gage FH. «Intranuclear aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain.» *J. Neurosci.*, 2000: 20:219-29.
- Seong IS, Ivanova E, Lee JM, Choo YS, Fossale E, Anderson M, Gusella JF, Laramie JM, Myers RH, Lesort M, MacDonald ME. «HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism.» *Hum Mol Genet.* , 2005: 14(19):2871-80.
- Sharp A.H., Loev S.J., Shilling G., Li S.H., Li X.J., Bao J., Wagster M.V., Kotzuk J.A., Steiner J.P., Lo A., «Widespread expression of Huntington's disease gene(IT15) protein product.» *Neuron*, 1995: 14:1065-1074.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. « CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals.» *Annu Rev Biochem*, 1999: 68:821-861.
- Shehadeh J, Fernandes HB, Zeron Mullins MM, Graham RK, Leavitt BR, Hayden MR, Raymond LA. «Striatal neuronal apoptosis is preferentially enhanced by NMDA receptor activation in YAC transgenic mouse model of Huntington disease.» *Neurobiol Dis.* , 2006: 21(2):392-403.
- Shelbourne, PF., Killen N., Hevner R., Johnston HM., Tecott L., Lewandoski M et al. «A Huntington's disease CAG expression at the murine Hdh locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice.» *Hum. Mol. Genet.*, 1999: 8:763-774.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. «Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB.» *Neuron*, 1990: 4:571-582.
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. « CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. » *Science*, 1991: 252:1427-1430.
- Shimohata T, Nakajima T, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K, Sano Y, Ishiguro H, Sakoe K, Ooshima T, Sato A, Ikeuchi T, Oyake M, Sato T, Aoyagi Y, Hozumi I, Nagatsu T, Takiyama Y, Nishizawa M, Goto J, Kanazawa I, Davidson. «Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription.» *Nat Genet.*, 2000 : 26(1):29-36.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. «CREB and memory. » *Annu Rev Neurosci*, 1998: 21:127-148.
- Sipione, S. & Cattaneo E. «Modelling Huntington's disease in cell, flies and mice.» *Mol. Neurobiol.*, 2001: 23:21-51.
- Snell RG, MacMillan JC, Cheadle jp, Fenton I, Lazzarou I p., Davies P., MacDonald M.E., Gusella J F, Harper P.S., Shaw D.J. «Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in huntington's disease.» *Nat. Genet.*, 1993: 4. 387-392.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. « Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. » *Annu Rev Neurosci*, 2001: 24:1217-1281.
- Spillantini MG, Goedert M. «Tau protein pathology in neurodegenerative diseases.» *Trends Neurosci*, 1998: 21:428-433.

- Stanciu M, Radulovic J, Spiess J. «Phosphorylated cAMP response element binding protein in the mouse brain after fear conditioning: relationship to Fos production.» *Brain Res Mol Brain Res* , 2001: 94:15-24.
- Steffan, JS., Bodai L., Pallos J., poelman M., MacCampbell A., Apostol BL., KazansteV A., Schmidt E., Zhu YZ., Greenwald M., Kurokawa R., Housman DE., Jackson GR., Marsh JL., Thompson LM. «Histone deacetylase inhibitor arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*.» *Nature*, 2001 : 413:739-743.
- Sugars KL, Brown R, Cook LJ, Swartz J, Rubinsztein DC. «Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis.» *J Biol Chem.* , 2004 : 279(6):4988-99.
- Sun Z, Del Mar N, Meade C, Goldowitz D, Reiner A. «Differential changes in striatal projection neurons in R6/2 transgenic mice for Huntington's disease.» *Neurobiol Dis* , 2002: 11:369-385.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. «Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease.» *J Exp Med.* , 1996: 184(4):1331-41.
- Takano H., Gusella J.F. «The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF-kB/Rel/dorsal family transcription factor.» *BMC Neurosci.*, 2002: 3:15.
- Tanaka Y, Naruse I, Hongo T, Xu M, Nakahata T, Maekawa T, Ishii S. «Extensive brain hemorrhage and embryonic lethality in a mouse null mutant of CREB-binding protein. » *Mech Dev*, 2000: 95:133-145.
- Tang TS, Slow E, Lupu V, Stavrovskaya IG, Sugimori M, Llinás R, Kristal BS, Hayden MR, Bezprozvanny I. «Disturbed Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease.» *Natl Acad Sci U S A.* , 2005: 102(7):2602-7.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. «The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta.» *Nat Neurosci* , 2001: 4:813-818.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. «Caspases: enemies within.» *Science.*, 1998 : 281(5381):1312-6.
- Trottier Y., Biancalana V. and Mandel J.L. «Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset.» *J. Med. Genet*, 1994: 31:377-382.
- Waldvogel HJ, Faull RL, Williams MN, Dragunow M. «Differential sensitivity of calbindin and parvalbumin immunoreactive cells in the striatum to excitotoxins.» *Brain Res* , 1991: 546:329-335.
- Walton M, Woodgate AM, Muravlev A, Xu R, During MJ, Dragunow M. « CREB phosphorylation promotes nerve cell survival.» *J Neurochem* , 1999: 73:1836-1842.
- Wei F, Qiu CS, Liauw J, Robinson DA, Ho N, Chatila T, Zhuo M. «Calcium calmodulin-dependent protein kinase IV is required for fear memory.» *Nat Neurosci* , 2002: 5:573-579.

- Wellington CL, Ellerby LM, Gutekunst CA, Rogers D, Warby S, Graham RK, Loubser O, van Raamsdonk J, Singaraja R, Yang YZ, Gafni J, Bredesen D, Hersch SM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW, Hayden MR. «Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease.» *J. Neurosci.*, 2002: 22:7862-7872.
- Wellington CL, Singaraja R, Ellerby L, Savill J, Roy S, Leavitt B, Cattaneo E, Hackam A, Sharp A, Thornberry N, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR. «Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells.» *J Biol Chem.* , 2000: 275(26):19831-8.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME. «Calcium regulation of neuronal gene expression. .» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001: 98:11024-11031.
- Wheeler VC, Auerbach W, White JK, Srinidhi J, Auerbach A, Ryan A, Duyao MP, Vrbanc V, Weaver M, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME. «Early phenotypes that presage late-onset neurodegenerative disease allow testing of modifiers in Hdh CAG knock.in mice.» *Hum. Mol. Genet.*, 2002: 11:633-640.
- White, JK., Auerbach W., Duyao MP., Vonsattel Jp., Gusella JF., Joyner AL. et al. «Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion.» *Nat. Genet.*, 1997: 17:404-10.
- Widmer HR, Hefti F. «Neurotrophin-4/5 promotes survival and differentiation of rat striatal neurons developing in culture.» *Eur J Neurosci.* , 1994 : 6(11):1669-79.
- Xia, J. Lee D.H., Taylor J., Vandelft M. & Truant R. «Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal.» *Hum. Mol. Genet.*, 2003: 1393-1403.
- Xing L, Gopal VK, Quinn PG. « cAMP response element-binding protein (CREB) interacts with transcription factors IIB and IID.» *J Biol Chem* , 1995: 270:17488-17493.
- Yamamoto, A, Lucas JJ, Hen R. «Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease.» *Cell*, 2000: 101:57-66.
- Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB. «NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. .» *Science* , 1988: 241:981-983.
- Zamzami, N., Hirsch T., Dallaporta B., Petit P.X., and Kroemer G. «Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: Apoptosis and necrosis.» *J.Bionerg. Biomembr.*, 1997: 29:185-193.
- Zeitlin, S., Liu JP., Chapman DL., Papaioannou VE., Efstratiadis A. «Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue.» *Nat. Genet*, 1995: 11:155-63.
- Zeron MM, Fernandes HB, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, Baimbridge KG, Hayden MR, Raymond LA. «Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease.» *Mol Cell Neurosci.* , 2004 : 25(3):469-79.
- Zeron, MM., Hansson O., Chen N., Wellington CL., Leavitt BR., Brundin P., Hayden MR., Raymond LA. «Increased sensitivity to N-methyl-d-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease.» *Neuron*, 2002: 33:849-860.

- Zhang Y, Leavitt BR, van Raamsdonk JM, Dragatsis I, Goldowitz D, MacDonald ME, Hayden MR, Friedlander RM. «Huntingtin inhibits caspase-3 activation.» *EMBO J.* , 2006 : 25(24):5896-906.
- Zuccato C, Cattaneo E. «Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease.» *Prog Neurobiol.* , 2007 : 81(5-6):294-330.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. «Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. .» *Science* , 2001: 293:493-49.
- Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt BR, Hayden MR, Timmusk T, Rigamonti D, Cattaneo E. «Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. .» *Nat Genet* , 2003: 35:76-83.
- Zuccato C., Liber D., Ramos C., et al. «Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BNF delivery.» *Pharmacol. Res.*, 2005: 52: 133-39.