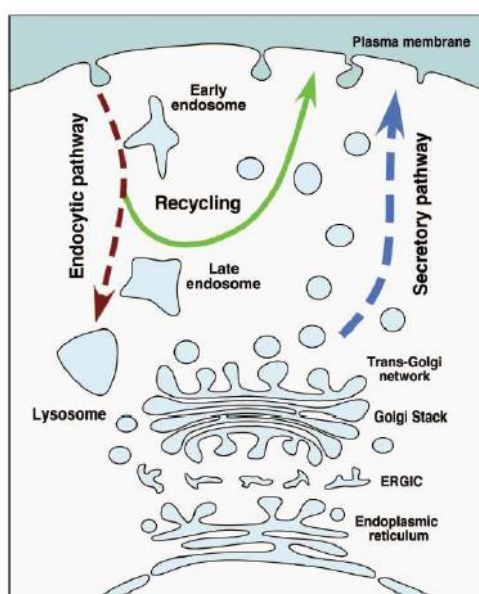


## LE DEMENZE: RUOLO DEGLI ENDOSOMI

Non esistono ancora farmaci capaci di contrastare queste malattie neurodegenerative che sono fra le cause più importanti di disabilità, di spesa sociale e di mortalità delle persone anziane. La malattia di Alzheimer (AD), la forma più frequente di demenza, ha patogenesi complessa che coinvolge diversi tipi di cellule, fattori vari e pathway che agiscono isolatamente o anche in associazione. I criteri diagnostici di AD sono oggetto di ricerca: la precocità della diagnosi consente di attuare alcune iniziative preventive di non certo successo; oggi si fa diagnosi preclinica di AD e si propone addirittura un pre-caregiver!

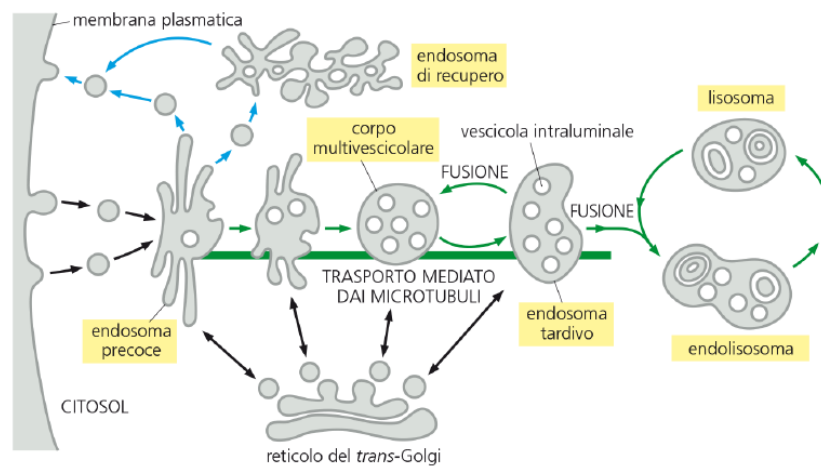
L'AD ha molte vie patogenetiche: qui saranno considerati soltanto alcuni aspetti legati all' endocitosi cellulare dell'amiloide che presentano reali prospettive di intervento farmacologico/terapeutici. Il difettoso traffico intracellulare è ritenuto una possibile causa di AD: così le anomalie del network endosoma-lisosoma sono un marker di AD e si associano alla amiloidogenesi in quanto intervengono nel processing e clearance del precursore dell'amiloide (APP); alcuni geni che promuovono l'amiloidogenesi (come APP, PSEN 1/2, e ApoE4) influenzano il funzionamento del sistema endosomiale-lisosomiale. Anche la composizione delle membrane cellulari e in particolare il loro contenuto in acidi grassi polinsaturi omega-3 ha un ruolo nel processo endocitosico (<http://science.sciencemag.org/content/sci/345/6197/693.full.pdf> ) e nel riciclo delle vescicole sinaptiche.

Il traffico intracellulare è descritto schematicamente nella figura che segue; dopo la sintesi la proteina APP è modificata nella via secretoria (freccia blu); raggiunta la superficie della cellula, l'APP è interiorizzata e indirizzata al compartimento lisosomiale (freccia rossa) oppure riciclata sulla membrana plasmatica (freccia verde); la via non amiloidogena è quella alla superficie della cellula dove è presente la  $\alpha$  - secretasi; negli organelli della via endocitica dove operano la  $\beta$ - e la  $\gamma$ -secretasi, si forma l'amiloide (Neurology 2006; 66S: 569). (ERGIC indica endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment).



L' *APOE4* è il fattore di rischio genetico più importante per la LOAD (late onset Alzheimer disease) ; il meccanismo di azione di apoE4 è stato solo in parte chiarito: utilizzando CRISPR/Cas9 e iPSCs - induced pluripotent stem cells - si è valutato l' effetto della APOE4 su diversi tipi di cellule del SNC; il profilo trascrizionale ha identificato centinaia di geni espressi dai diversi tipi cellulari : i più interessati sono quelli coinvolti nelle attività delle sinapsi (neuroni), nel metabolismo lipidico (astrociti) e nella risposta immunitaria (microglia). I neuroni APOE4 mostrano elevato numero di sinapsi e alta secrezione di A $\beta_{42}$  rispetto ai neuroni APOE3; gli astrociti APOE4 hanno ridotta captazione della A $\beta$  e accumulano colesterolo rispetto agli astrociti APOE3; la APOE4- microglia ha morfologia alterata e ridotta fagocitosi. Quindi si può ipotizzare che convertendo nelle cellule cerebrali l'apoE4 in APOE3 l'attenuazione della patologia Alzheimer like. ([allegato](#)).

I processi di recycling (vedi figura che segue e la precedente) sono complessi: l'omeostasi della endocitosi mantiene la funzionalità dei neuroni e delle altre cellule del sistema nervoso che risulta compromessa nella AD. I meccanismi coinvolti sono molteplici; i fattori di rischio per la demenza agiscono in modo vario (da soli o in associazione) sulla endocytic pathway (omeostasi, endocytic sorting, trafficking e signaling) che - si ripete- è fondamentale per mantenere la funzione neuronale; nella AD questa pathway o via metabolica è compromessa.

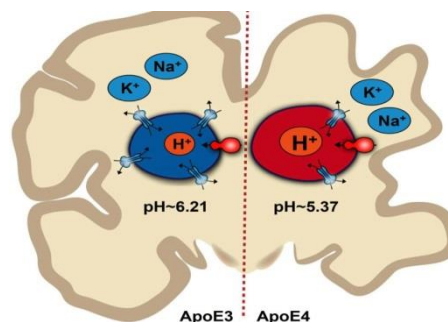


I processi descritti richiedono energia e ossigeno; pertanto l'ipossia e le alterazioni metaboliche-energetiche possono concorrere alla compromissione della endocitosi. Anche la composizione delle membrane delle cellule del sistema nervoso e dei rispettivi organuli subcellulari possono influenzare il processo di vescicolazione che sta alla base dell'endocitosi e anche del trasporto intracellulare dei componenti. Nel 2007 sperimentalmente Tsai e coll. dimostrarono che aumentando l'acetilazione degli istoni con *farmaci inibitori della istone deacetilasi* (HDAC) si otteneva un maggior numero di sinapsi, sprouting dei dendriti, miglioramento dell'apprendimento e della memoria a lungo termine; questo dato sperimentale suggerì una via per la terapia farmacologica dei pazienti con demenza (Nature 2007; 447: 173). Le malattie neurodegenerative sono dipendenti anche da modificazioni epigenetiche come l'acetilazione dell'istone e la sua deacetilazione, processi che concorrono alla stabilità della struttura e della conformazione della cromatina. Il funzionamento appropriato della istone deacetilasi ha un ruolo rilevante nel mantenere la normale struttura delle cellule nervose; l'acetilazione dell'istone è alterata in diverse malattie neurodegenerative compresa la AD; i farmaci HDAC aumentano la plasticità sinaptica, l'apprendimento e la capacità mnemonica. Si ricorda che gli HDAC che inibiscono le istone-deacetilasi, hanno una lunga storia come stabilizzatori

dell'umore ed anti-epilettici; più recentemente sono stati utilizzati anche in oncologia e come anti-infiammatori.

Gli effetti dei farmaci HDAC - **histone deacetylase inhibitors** - sono stati studiati in colture cellulari di astrociti di topo ingegnerizzati con la variante genetica APOE4; essi aumentarono l'espressione di NHE6 (vedi più avanti) negli astrociti di topo che non avevano la variante genetica citata. Per misurare il pH all'interno degli endosomi degli astrociti integri, Prasad e Rao hanno usato sonde sensibili al pH che assorbite dagli endosomi, emettono luce in base ai livelli di pH; hanno potuto osservare che le linee cellulari di topo contenenti la variante genica del AD presentavano più endosomi acidi (una media di 5,37 pH) rispetto alle linee cellulari senza la variante del gene (media di 6,21) (si veda la precedente figura); i farmaci HDAC hanno quindi corretto lo squilibrio del pH all'interno degli endosomi e ripristinato la LRP1 sulla superficie dell'astrocita, con il risultato di eliminare più efficacemente la proteina  $\beta$ -amiloide. La maggior parte dei farmaci HDAC non attraversano però la barriera emato-encefalica.

Gli Astrociti sono stati studiati per verificare se nella malattia di Alzheimer (AD) c'è malfunzionamento del sistema cellulare che provvede a riciclare molecole; è stato osservato che gli endosomi astrocitari presentano squilibrio acido-basico, cioè del pH (vedi figura), Gli astrociti sono capaci di rimuovere le proteine della  $\beta$  Amiloide ( $\beta$ A) dagli spazi interneuronali evitando così il loro accumulo in forma di placche amiloidi che inducono come è noto degenerazione dei neuroni. La figura sotto segnala il pH acido degli endosomi degli astrociti portatori di apolipoproteina E4 (si veda una NEWS-SIGG precedente) vedi [allegato](#).



Gli endosomi sono più grandi e abbondanti nelle cellule cerebrali di persone con malattia di Alzheimer; se i meccanismi endosomiali non funzionano opportunamente si può verificare accumulo di amiloide negli spazi intorno ai neuroni.

Per trasportare il loro carico da un posto all'altro, gli endosomi utilizzano un sistema sensibile anche al pH: se l'endosoma diventa più acido, il carico tende ad essere intrappolato all'interno dell'endosoma della cellula; invece quando il contenuto di endosoma è più alcalino, il carico rimane più a lungo sulla superficie della cellula. Ben 10 geni su 100 presenti nel cervello con neuropatologia da Alzheimer (rispetto a controlli) hanno un funzionamento che risente del pH.

In un gruppo di campioni di tessuto cerebrale di 96 persone con malattia di Alzheimer e 96 sane, l'espressione genica del protone shuttle negli endosomi, nota come NHE6 - che modula il pH degli endosomi - Na/H Exchanger o NHE6 - era di circa il 50% più bassa nelle persone con malattia di Alzheimer rispetto a quelle con cervello normale. Nelle cellule cresciute da persone con malattia di Alzheimer e in astrociti di topo ingegnerizzati per trasportare una variante del gene della malattia di Alzheimer umano, la quantità di NHE6 era circa la metà della quantità trovata nelle cellule normali.

Per misurare l'equilibrio del pH all'interno degli endosomi senza rompere l'astrocita, Prasad e Rao hanno utilizzato sonde sensibili al pH che sono assorbite dagli endosomi ed emettono luce in base ai livelli di pH. Hanno scoperto che le linee cellulari di topo contenenti la variante del gene della malattia di Alzheimer presentavano più endosomi acidi (una media di 5,37 pH) rispetto alle linee cellulari senza la variante del gene (media di 6,21 pH). Se il funzionamento di NHE6 non è corretto, gli endosomi diventano acidi e indugiano di più all'interno degli astrociti, con rallentata eliminazione della  $\beta$ -amiloide.

Anche la proteina chiamata LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein) capace di raccogliere proteine  $\beta$ -amiloide all'esterno dell'astrocita per consegnarle agli endosomi, era diminuita alla superficie degli astrociti, ingegnerizzati con la variante del gene APOE4, comunemente legata alla malattia di Alzheimer ad esordio tardivo (LOAD).

Prasad e Rao hanno testato nove tipi di inibitori HDAC su colture cellulari di astrociti di topo progettati con la **variante del** gene APOE4. Gli inibitori HDAC ad ampio spettro hanno aumentato l'espressione di NHE6 ai livelli associati agli astrociti di topo privi della variante genetica dell'Alzheimer. Hanno anche scoperto che i farmaci HDAC erano in grado di correggere il pH all'interno degli endosomi e ripristinare LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein - o APOER: apolipoprotein E receptor) sulla superficie dell'astrocita, accelerando la clearance della proteina  $\beta$ -amiloide.

La possibilità di modificare il fenotipo della apolipoproteina E in vivo con una strategia genetica è stata riportata anche dal quotidiano La Repubblica (vedi [qui](#)) il 3 Marzo 2019; il Trial è in corso; i dettagli sono visualizzabili [qui](#); aspettiamo i risultati. Ulteriori ricerche nel settore della genetica delle demenze potrebbero fornire nuove vie per intervenire efficacemente vedi [qui](#).