

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA E SCIENZE DELLA
SALUTE "VINCENZO TIBERIO"



Dottorato in Medicina Traslazionale e Clinica ciclo XXXIV

SSD: MED/26 – NEUROLOGIA

Tesi di dottorato

**"Studio dell'acilpeptide idrolasi (APEH) e del proteasoma
nell'insorgenza di malattie neurodegenerative e loro
possibile utilizzo come marker diagnostici"**

Tutors

Prof. **Ciro COSTAGLIOLA**

Prof. **Alfonso DI COSTANZO**

Candidata

Carmela FUSCO

Coordinatore

Prof. **Marco SARCHIAPONE**

Indice

| | |
|---|----|
| 1.Introduzione | 4 |
| 1.1 Il ruolo chiave della proteostasi nelle malattie neurodegenerative | 5 |
| 1.1.1. La malattia di Alzheimer..... | 8 |
| 1.1.2. La malattia di Parkinson..... | 13 |
| 1.2 Lo stress ossidativo | 18 |
| 1.2.1 Il complesso ubiquitina proteasoma ed il suo coinvolgimento nei meccanismi di catabolismo proteico..... | 24 |
| 1.2.2 L'Acilamminoacil-peptidasi ed il catabolismo delle proteine acetilate..... | 33 |
| 1.3 Biomarcatori per la diagnosi delle malattie neurodegenerative | 41 |
| 1.3.1 Biomarcatori da sangue..... | 43 |
| 1.4 Risultati preliminari | 45 |
| 2. Scopo della tesi | 50 |
| 3. Materiali e metodi | 53 |
| 3.1 Reclutamento e pratiche etiche..... | 54 |
| 3.2 Realizzazione di una BioBanca di Ricerca..... | 56 |
| 3.3 Citometria a flusso..... | 58 |
| 3.3.1 Isolamento cellulare: il <i>Sorting</i> | 62 |
| 3.4 Isolamento eritrocitario..... | 65 |
| 3.5 Estrazione di proteine totali da sangue e frazioni cellulari del sangue..... | 67 |
| 3.6 Saggi enzimatici mediante spettrofluorimetria..... | 69 |

| | |
|---|------------|
| 3.7 Purificazione di RNA totale ed analisi di espressione quantitativa tramite Real Time PCR..... | 72 |
| 3.8 Analisi statistiche..... | 78 |
| 4. Risultati e discussione..... | 80 |
| 4.1 Saggi di attività enzimatica..... | 81 |
| 4.1.1 Attività esopeptidasica dell'APEH e chimotriptica del proteasoma su sangue intero..... | 82 |
| 4.1.2 Attività esopeptidasica dell'APEH e chimotriptica del proteasoma in varie frazioni cellulari del sangue (granulociti, linfociti, monociti ed eritrociti)..... | 85 |
| 4.2 Analisi di espressione genica..... | 87 |
| 4.3 Analisi statistiche..... | 97 |
| 5. Conclusioni..... | 99 |
| 5.1 Conclusioni e prospettive future..... | 100 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 104 |

1

INTRODUZIONE

P

er ogni organismo vivente, i processi di crescita, invecchiamento e morte sono causa di eventi naturali che determinano la durata di vita massima di ciascuna specie, collegati allo stile di vita e all'ambiente in cui vive la specie stessa. Durante questi processi, ogni singola molecola e cellula dell'organismo invecchia, subendo modifiche spesso irreversibili; ne sono esempio le proteine, sia quelle citosoliche ma anche quelle presenti in circolo nei liquidi corporei, che vengono continuamente modificate chimicamente fino a che riconosciute ed eliminate; oppure, i telomeri (estremità dei cromosomi) che, ad ogni divisione cellulare, si accorciano e si suppone racchiudano il "segreto dell'orologio biologico" definendo la durata di vita di ciascuna cellula dell'organismo prima che essa vada incontro a morte cellulare programmata.

È proprio nei processi di invecchiamento cellulare, che prevedono il lento e progressivo deterioramento dei sistemi biologici molecolari all'interno di ogni singola cellula, che si inseriscono i processi di "*neurodegenerazione*", ovvero processi rappresentati dalla graduale perdita di funzione e/o morte di neuroni e cellule accessorie, fino alla compromissione di tutto il sistema nervoso. Questi processi sono alla base di molte malattie, più comunemente chiamate malattie neurodegenerative (ND), caratterizzate tutte da eventi che causano aggregazione e accumulo di proteine ed altre molecole che portano a disfunzioni cellulari, perdita di connessioni sinaptiche e danni cerebrali irreversibili; per tale motivo, vengono anche definite "*proteinopatie*".

1.1 Il ruolo chiave della proteostasi nelle malattie neurodegenerative

All'interno di ogni singola cellula, le proteine svolgono e mediano funzioni essenziali non solo per la cellula stessa ma anche per l'organo che la cellula va a costituire e quindi per tutto l'organismo; per questo motivo, la sintesi e la degradazione di queste molecole è sottoposta a processi biochimici finemente regolati e controllati. I processi che regolano questo equilibrio, più comunemente chiamato "*omeostasi proteica*", includono il ripiegamento delle proteine, la loro sintesi e produzione nonché assemblaggio (incluse le modifiche post-traduzionali), la degradazione ed il disassemblaggio, il traffico e la localizzazione cellulare. È noto che tutti questi processi devono necessariamente essere mantenuti in uno stato di equilibrio tra loro ma in che modo essi sono coordinati spazio-temporalmente resta ancora poco chiaro ed è da sempre oggetto di studio di molti gruppi di ricerca. Inoltre, è stato visto che l'interruzione di uno o più di questi processi, o comunque il malfunzionamento di uno di essi, implica l'insorgenza di una varietà di stati patologici, così come nei processi di invecchiamento (**Figura 1.1**) [1].

Caratteristiche di tutte le ND sono proprio il mal ripiegamento, l'aggregazione e l'accumulo di proteine che portano a disfunzioni cellulari, perdita di connessioni sinaptiche e danni cerebrali. Nonostante vi è un coinvolgimento di proteine distinte in ogni ND, i processi che portano allo sviluppo di queste patologie sono molto comuni. Le ND includono malattie altamente debilitanti, come l'Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), la malattia di Huntington (HD), le atassie spinocerebellari, la demenza frontotemporale, la degenerazione corticobasale, la paralisi sopranucleare progressiva, l'encefalopatia traumatica cronica, l'atrofia

multisistemica, la demenza con corpi di Lewy e malattie da prioni (PrD). Nonostante le grandi differenze nella manifestazione clinica, queste malattie hanno molte caratteristiche comuni, tra cui la loro natura cronica e progressiva, l'aumento della prevalenza con l'età, la distruzione dei neuroni in aree specifiche del cervello, il danneggiamento della rete di connessioni sinaptiche e la graduale perdita della massa cerebrale. Un altro evento comune, che si pensa sia alla base di queste malattie, è proprio il progressivo accumulo di aggregati proteici mal ripiegati in strutture ben ordinate, che portano tutte queste patologie ad avere una principale caratteristica comune che è quella della perdita di funzioni legate alla proteostasi [2].

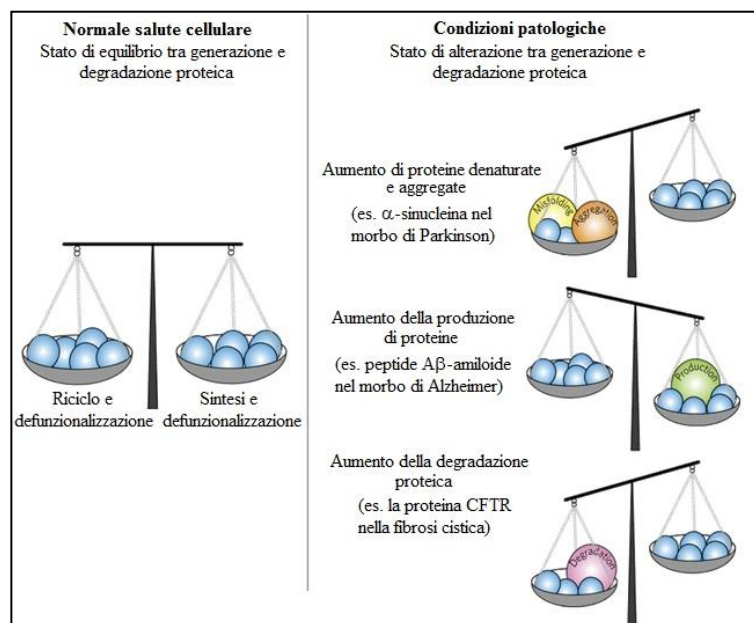


Figura 1.1. Bilanciamento della proteostasi e potenziali perturbazioni che portano a situazioni patologiche. In condizioni normali di omeostasi cellulare, la sintesi proteica, l'assemblaggio, il corretto ripiegamento e la localizzazione di complessi proteici sono bilanciati dai loro tempestivi disassemblaggio e degradazione. In condizioni patologiche, questo equilibrio è perturbato in molteplici modi, in parte a causa di cambiamenti nel misfolding e aggregazione, o per iperproduzione e iperdegradazione delle proteine [1].

Fra le ND più diffuse e che condividono molti aspetti clinici e caratteristiche patologiche, vi sono l'AD ed il PD. Secondo l'ultimo censimento [3], si stima che nel 2015, AD e PD hanno colpito rispettivamente circa 29,8 milioni e 6,2 milioni di persone nel mondo.

1.1.1 La malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer è la forma più comune di demenza degenerativa, ovvero una condizione patologica caratterizzata da un declino delle funzioni cognitive, come memoria (a breve e a lungo termine) e almeno una tra pensiero astratto, capacità critica, linguaggio, orientamento spazio-temporale, di grado tale da rendere il paziente non autonomo nelle attività quotidiane, con conservazione dello stato di coscienza vigile. Questa malattia ha la caratteristica di essere progressivamente invalidante, con esordio in età presenile (oltre i 65 anni).

Fu nel 1901 uno psichiatra tedesco, il dottor Alois Alzheimer, a descriverne per primo le caratteristiche osservando una sua paziente (Auguste Deter, una donna cinquantenne) alla quale mostrò parecchi oggetti e successivamente domandò che cosa le era stato indicato [4]. Lei non riuscì a ricordare. Inizialmente registrò il suo comportamento come "disordine da amnesia di scrittura", ma la signora Auguste Deter fu la prima paziente a cui venne diagnosticata quella che in seguito sarebbe stata conosciuta come malattia di Alzheimer (**Figura 1.2**). Questa paziente presentava problemi progressivi alla memoria, al linguaggio e nel comportamento e quando morì, il dottor Alzheimer ne esaminò il cervello ed identificò delle modificazioni del tessuto quali: atrofia cerebrale, dense deposizioni di beta-amiloide attorno alle cellule nervose (le placche neuritiche) e grovigli di fibre costituiti dalla proteina *Tau* iperfosforilata (gli accumuli neurofibrillari) all'interno delle cellule (**Figura 1.3**). Sebbene questa patologia sia stata identificata più di 100 anni fa, l'interesse della ricerca verso i sintomi, le cause, i fattori di rischio che la caratterizzano ed i possibili trattamenti è cresciuto solo negli ultimi 30 anni. Attualmente

le cause che conducono allo sviluppo di questa patologia sono ancora ignote e l'indagine sulle cure da adottare procede lentamente, soprattutto per la difficoltà di diagnosi e analisi di tale patologia, spesso certe e sicure solo *post mortem*.

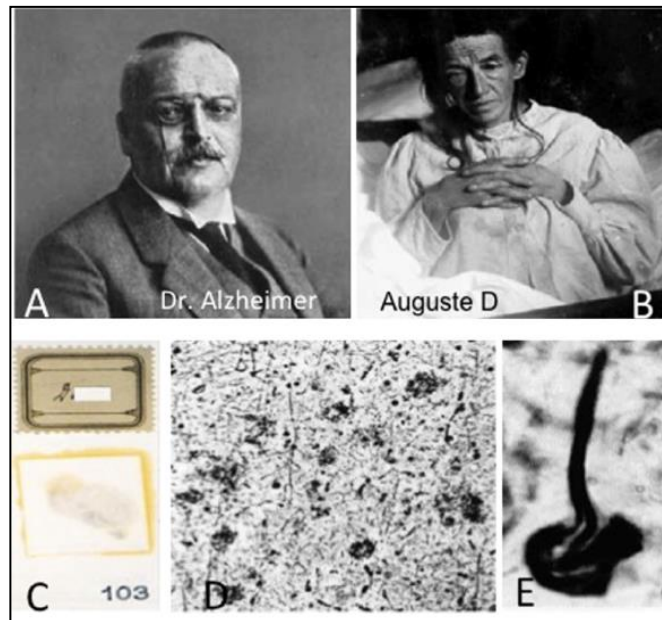


Figura 1.2. (A) Fotografie del Dott. Alzheimer e (B) della paziente Auguste Deter. (C) Immagine delle diapositive istologiche post mortem originali che mostrano placche neuritiche impregnate d'argento (D) e un groviglio neurofibrillare (E) nel cervello di Auguste Deter. Le foto A, B e D sono state trovate in Internet. Le immagini C ed E sono state prese da un articolo su Internet pubblicato venerdì 3 novembre 2006 da MoCostandi- Morbo di Alzheimer, Storia delle neuroscienze, 100 anni della malattia di Alzheimer.

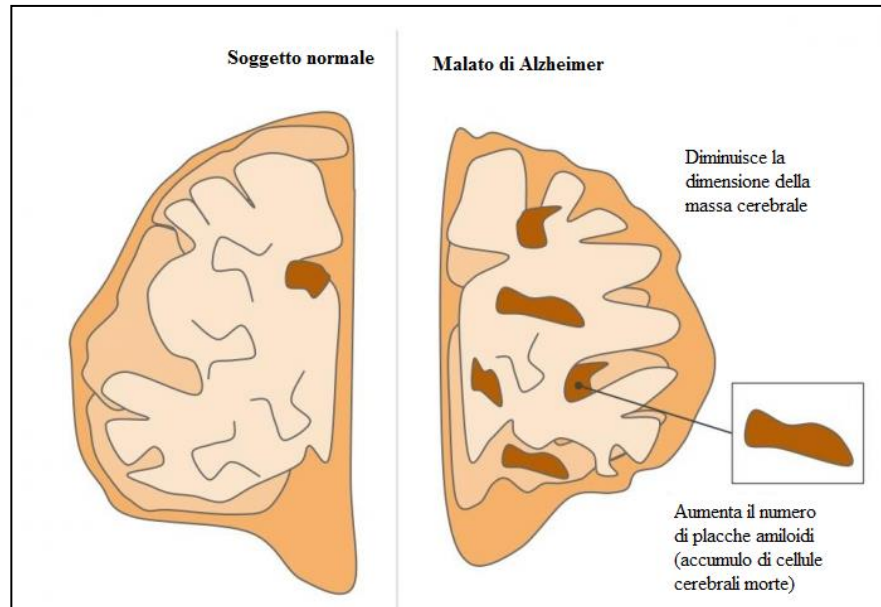


Figura 1.3. Schematizzazione di una sezione istologica di un cervello di un soggetto sano e di un soggetto malato di Alzheimer. Le principali differenze sono la riduzione delle dimensioni della massa cerebrale ed il concomitante aumento di placche amiloidi caratterizzate da un accumulo di cellule cerebrali morte.

Attualmente, quello che si conosce sulla malattia di Alzheimer è che si riscontra sempre un accumulo del peptide β -amiloide, il maggior costituente delle placche senili, nei neuroni, provocandone la morte, e nella parete dei vasi cerebrali [5, 6]. Il peptide β -amiloide è un frammento di una proteina più estesa identificata come proteina transmembrana precursore dell'amiloide (APP) codificata dal cromosoma 21 e processata attraverso due vie proteolitiche, quella della α -secretasi, che non porta alla produzione di β -amiloide, e quella delle secretasi β e γ e della via endosomo-lisomiale, che invece portano alla produzione di β -amiloide [6](Figura 1.4).

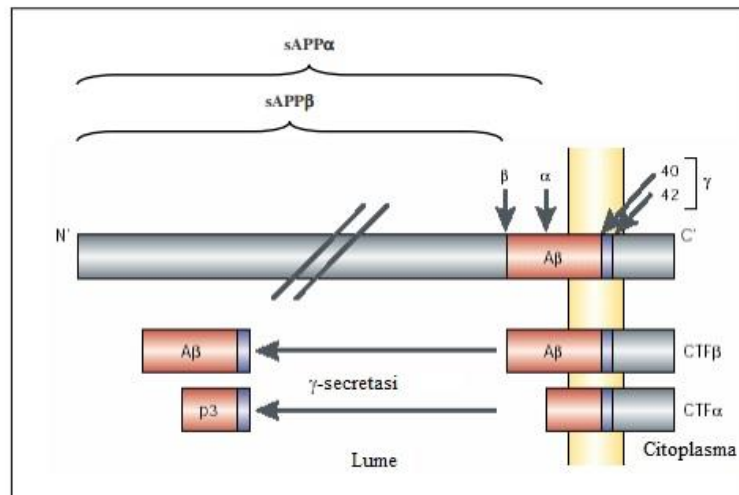


Figura 1.4. Generazione del peptide beta-amiloide a partire dalla proteina APP (precursore della proteina amiloide).

L'AD è anche considerata una *tauopatia*, in quanto facente parte di patologie neurodegenerative proteino-correlate che presentano un metabolismo anomalo della proteina *tau*, la quale si accumula interferendo con le normali funzioni neuronali. Per questo, oltre alla placche senili, nell'AD sono presenti anche i cosiddetti "ammassi o gomitoli neurofibrillari" intraneuronali, composti proprio dalla proteina *tau*. Questa

proteina è espressa soprattutto nei neuroni, dove si lega ai microtubuli nel citoscheletro e li stabilizza. La proteina *tau* è normalmente regolata da meccanismi di fosforilazione: se essa è mutata è soggetta ad iperfosforilazione, così come avviene nell'AD, e diventa insolubile e si accumula come filamenti elicoidali accoppiati che aggregano formando grovigli neurofibrillari, con conseguente alterazione a livello dei microtubuli e del trasporto assonale, progressivamente sempre più difficoltoso [7] (**Figura 1.5**).

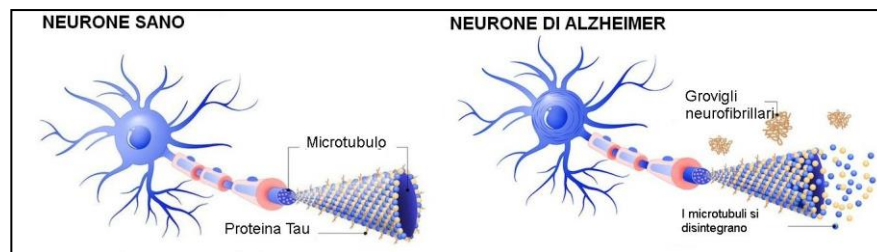


Figura 1.5. Rappresentazione di come la proteina tau stabilizza i microtubuli in un neurone sano ed invece, se iperfosforilata, forma dei grovigli che la sottraggono dall'azione positiva sui microtubuli, provocandone lo sfaldamento.

Altre modifiche biochimiche caratteristiche dell'AD sono la riduzione del neurotrasmettitore acetilcolina (ACh) [8] ma anche di altri neurotrasmettitori come la serotonina, la somatostatina e la norepinefrina.

Inoltre, è stato visto che un'altra componente che porta allo svilupparsi e stabilizzarsi della malattia dell'AD è rappresentata dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che contribuisce all'accumulo e alla deposizione del peptide β -amiloide [9].

1.1.2 La malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson è la seconda malattia neurodegenerativa più diffusa dopo l'Alzheimer, caratterizzata da tremore, rigidità muscolare, rallentamento dei movimenti volontari e da particolari modificazioni delle attività espressive (mimica, linguaggio e scrittura), con insorgenza di problemi cognitivi e comportamentali e demenza in fasi avanzate della malattia [10]. È una malattia comune soprattutto in soggetti anziani e si verifica dopo i 50 anni di età.

Fu descritta per la prima volta nel 1817 dal neurologo inglese James Parkinson (**Figura 1.6**), inizialmente col nome di “*paralisi agitante*”, pubblicando un saggio che ne descriveva sei casi [11]. Negli anni a seguire, molti altri neurologi hanno contribuito a definirne meglio le caratteristiche e, in particolare, Jean-Martin Charcot (**Figura 1.6**) riuscì a distinguerne gli effetti tra rigidità, debolezza e bradicinesia, ovvero un disordine che si traduce nella difficoltà di un individuo a replicare un movimento se non in maniera rallentata [11].



Figura 1.6. (A) Fotografie del Dott. James Parkinson, a cui si deve il nome del morbo di Parkinson, e (B) del Dott. Jean-Martin Charcot, uno dei principali neurologi che hanno contribuito maggiormente a comprendere meglio la patologia e che ha sostenuto la ridenominazione della malattia in onore di James Parkinson.

Jean-Martin Charcot sostenne anche la ridenominazione della malattia in onore di James Parkinson (**Figura 1.6**).

I sintomi motori tipici della condizione patologica del PD sono il risultato della perdita della trasmissione dopaminergica nello striato, in seguito alla progressiva morte cellulare dei neuroni che rilasciano dopamina e presenti nella *substantia nigra* (SN), una regione del mesencefalo (**Figura 1.7**). Oltre ai sintomi motori, nel PD ci può essere anche la concomitante presenza di sintomi non motori, quali: depressione, ansietà, deficit cognitivi, disturbi neuropsichiatrici, disfunzioni del sistema autonomo, disturbi del sonno e sintomi sensoriali. La causa che porta a questi sintomi e alla morte delle cellule neuronali è ancora da scoprire [12].

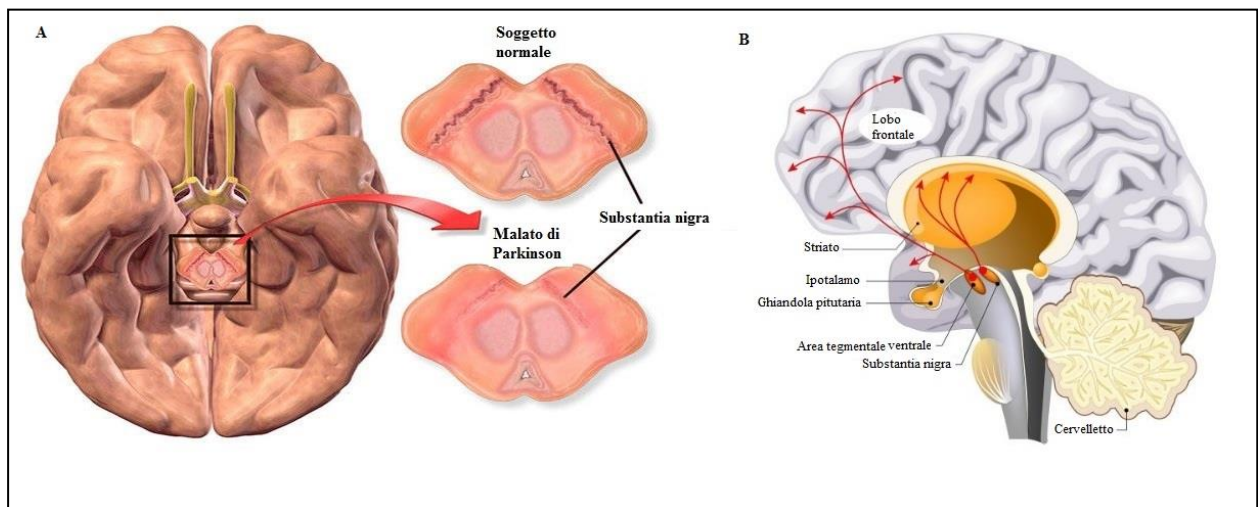


Figura 1.7. (A) Schematizzazione di una sezione istologica di cervello di un soggetto sano e di un soggetto malato di Parkinson. Le principali differenze si osservano a livello della *substantia nigra*, nettamente ridotta nei soggetti affetti dalla patologia. (B) Schema del percorso della dopamina nelle varie aree del cervello.

La diagnosi di questa patologia può essere fatta principalmente osservando i sintomi e, per conferma, si possono eseguire indagini di *imaging* cerebrale [13]. Oltre alla perdita

dei neuroni dopaminergici della SN, un'altra caratteristica tipica del PD è costituita dalla presenza di aggregati di α -sinucleina (α -syn) nelle inclusioni intra-citoplasmatiche chiamate corpi di Lewy (LB) [14]. L' α -sinucleina è una proteina ubiquitaria di 140 amminoacidi, a localizzazione citosolica e nucleare e sembra essere importante per il mantenimento della plasticità neuronale e per i processi che riguardano l'apprendimento di nuovi comportamenti. Dal punto di vista strutturale, questa proteina contiene tre domini principali: un dominio N-terminale che contiene strutture a α -elica, un dominio centrale idrofobico, probabilmente responsabile della formazione di aggregati (amiloidogenico), e un dominio C-terminale, caratterizzato dalla presenza di residui acidi e residui di serina e tirosina, che si pensa possa avere un ruolo nella interazione con altre proteine (**Figura 1.8**). È codificata da un gene localizzato sul cromosoma 4 (4q21). È una proteina solubile sia nella sua struttura primaria a elica che in condizioni native, non presenta una struttura terziaria [15].

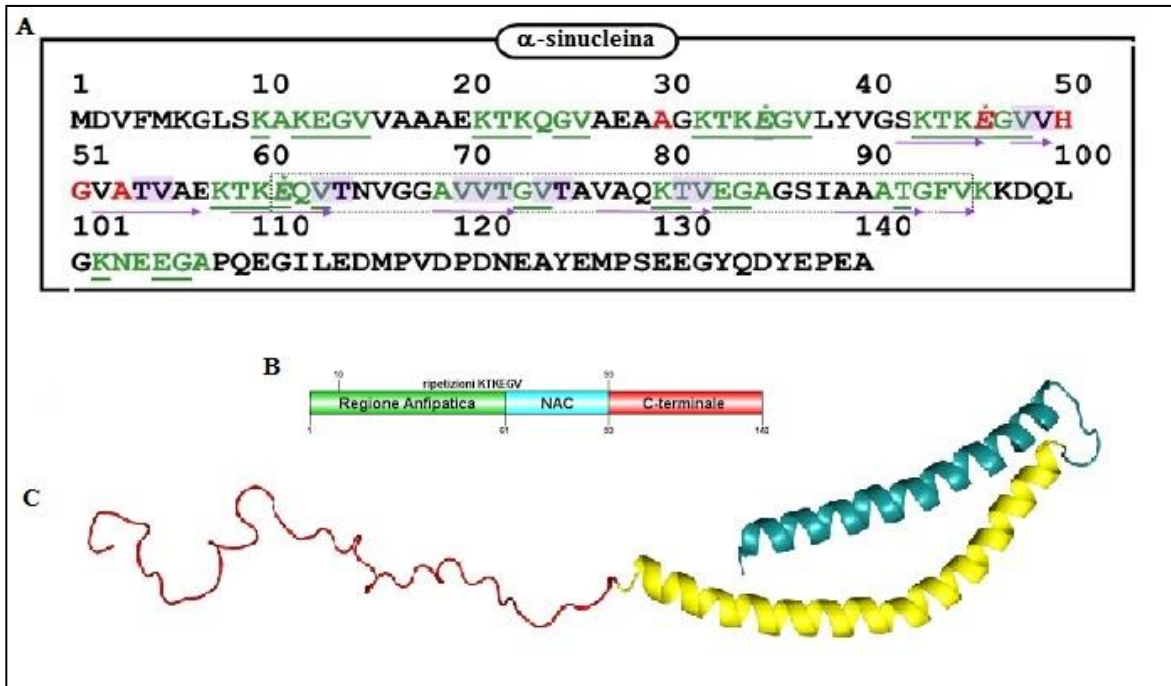


Figura 1.8. (A) Sequenza primaria amminoacidica dell' α -sinucleina umana. Proteina di 140 amminoacidi che nella parte centrale presenta nove ripetizioni imperfette per cui è predetta una struttura ad α -elica (in verde e sottolineate). In rosso, invece, sono indicati i siti sensibili a mutazione che possono dar luogo a foglietti β . (B) Struttura dell' α -sinucleina umana. (C) Modello di struttura secondaria dell' α -sinucleina umana, dal Protein Data Bank (PDB) su <https://www.rcsb.org/structure/1XQ8> e modellato utilizzando PyMOL.

È stato osservato che nella maggior parte dei malati di PD sono state trovate mutazioni in geni specifici. Uno di questi è proprio il gene che codifica per l' α -sinucleina. Un altro gene trovato mutato è la *parkina*, una ubiquitina ligasi, componente del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), che catalizza il legame della proteina ubiquitina alle catene polipeptidiche che devono essere degradate attraverso il proteasoma. Recentemente è stato osservato che, oltre che nel cervello, ci sono accumuli di α -sinucleina anche in altri organi, soprattutto negli stadi finali della malattia. Infatti, sono stati osservati depositi di questa proteina nel sistema nervoso enterico (ENS) di pazienti PD [16] ma è ancora poco chiaro se gli aggregati trovati in ENS siano biochimicamente simili a quelli che si

trovano nel cervello. È stato anche osservato che l'aggregazione di questa proteina potrebbe essere conseguenza di una ipersensibilità intestinale e che alterazioni della composizione batterica del microbiota intestinale sono comuni in pazienti PD [16].

In sintesi, si può dire che sia l'AD che il PD, così come altre malattie neurodegenerative, condividono fattori di rischio comuni che vanno ad alterare la proteostasi all'interno delle cellule, neuronali ma anche in tutte le altre cellule del corpo, andando a causare gravi danni a tutto l'organismo e contribuendo allo sviluppo della patologia [17].

1.2 Lo stress ossidativo

L'evoluzione dei sistemi viventi verso l'aerobiosi obbligata, sebbene sia stata vantaggiosa dal punto di vista energetico, ha portato gli organismi a dover contrastare obbligatoriamente alti livelli di stress ossidativo, provocati da specie chimiche reattive (SCR) che si suddividono in tre sottospecie: specie reattive dell'azoto (RNS), del carbonio (RCS) e dell'ossigeno (ROS). In particolare, i ROS portano alla formazione di forme radicaliche, con almeno un elettrone spaiato (es. anione superossido, $\bullet\text{O}_2^-$), e non radicaliche (es. perossido di idrogeno, H_2O_2).

Alla temperatura corporea la molecola di ossigeno O_2 è un biradicale, con due elettroni spaiati, ciascuno localizzato su un orbitale diverso. A causa, quindi, della sua configurazione elettronica l'ossigeno va incontro a riduzione monovalente (**Figura 1.9**).

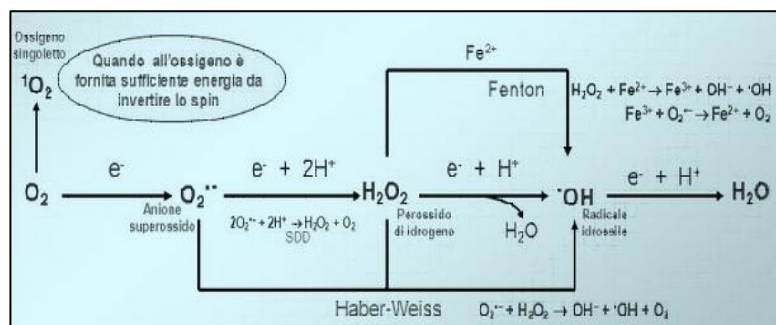


Figura 1.9. Riduzioni monovalenti dell'ossigeno molecolare alla base della generazione dei ROS.

Quando una molecola di ossigeno guadagna un elettrone si trasforma in un radicale anione superossido, $\bullet\text{O}_2^-$. L'aggiunta di un secondo elettrone (insieme con due protoni) trasforma quest'ultimo in perossido di idrogeno, H_2O_2 . Il perossido non è un radicale ma guadagna facilmente un altro elettrone dando origine ad un radicale idrossilico, $\bullet\text{OH}$, una

molecola chimica molto attiva, capace di dar luogo a reazioni a catena incontrollabili. Il radicale ossidrilico costituisce uno tra i maggiori responsabili di danni a carico delle strutture cellulari. La principale fonte endogena di ROS è costituita dalla catena di trasporto degli elettroni sulla membrana mitocondriale [18]. Recenti studi hanno permesso di identificare almeno due siti nella catena respiratoria dove si registra una sostanziale perdita di elettroni: a livello del gruppo flavinico del complesso I e a livello dell'ubichinone del complesso III. Per cui, se vi è disfunzione mitocondriale, la perdita di elettroni è maggiore e di conseguenza lo è anche la formazione di specie reattive dell'ossigeno.

Sulla membrana del reticolo endoplasmatico liscio è situata un'altra citocromo ossidasi, coinvolta nel trasporto elettronico: si tratta della famiglia multienzimatica della citocromo P450, deputata alla detossificazione dell'organismo, oltre che ad altre importanti funzioni. In questo ambito, l'ossidazione di acidi grassi insaturi e la bioattivazione di xenobiotici portano alla produzione di ROS.

Il complesso multienzimatico più importante coinvolto nella generazione di ROS, in particolare durante la trasduzione di segnali intracellulari, è la NADPH ossidasi. Questa è costituita da una citocromo b, presente nella membrana citoplasmatica, e da proteine leganti gruppi GTP (GTP binding proteins), a livello citoplasmatico. L'attivazione di questo sistema porta alla fosforilazione di particolari fattori citoplasmatici che traslocano a livello della membrana, legandosi alla citocromo b con il conseguente trasferimento di un elettrone all'ossigeno molecolare e produzione di superossido [19].

Oltre a fonti endogene, sopra citate, i ROS possono essere causati anche da fonti esogene, tra cui agenti ambientali come radiazioni elettromagnetiche, quali i raggi x e i raggi γ , e le radiazioni ultraviolette, che producono radicali liberi per trasferimento della loro energia a componenti cellulari o a molecole di acqua.

Più in generale, il danno da radicali liberi può interessare soprattutto le principali macromolecole biologiche (**Figura 1.10**): se interessa i fosfolipidi di membrana, può comportare la perdita di compartimentazione cellulare e di trasporti selettivi; quando colpisce gli acidi nucleici, provoca l'accumulo di mutazioni e quindi alterazioni dell'espressione genica; quando riguarda le proteine, in particolare l'ossidazione di alcuni gruppi amminoacidici, causa modificazioni della struttura e perdita di funzione enzimatica, recettoriale e di trasporto [20].

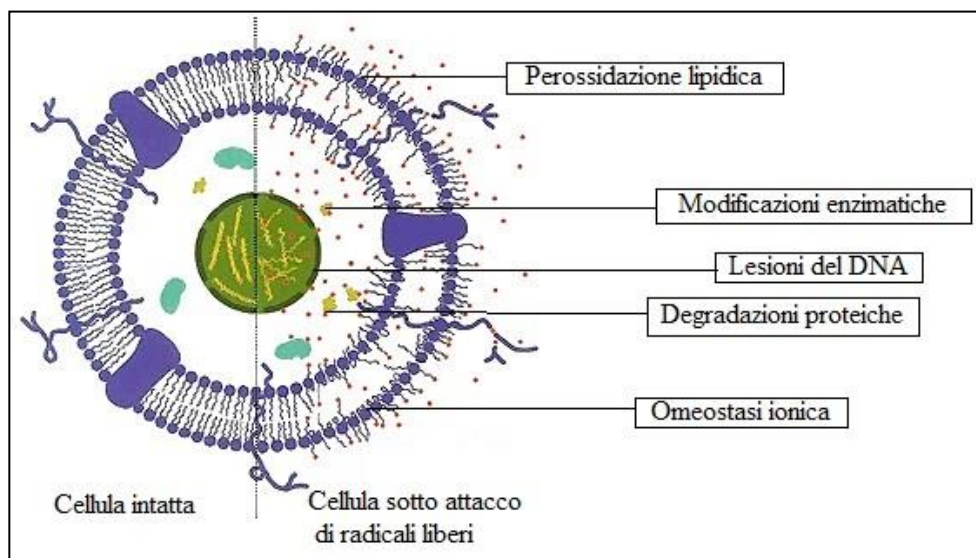


Figura 1.10. Principali danni da radicali liberi.

Per evitare gli innumerevoli danni causati dalle specie radicaliche più reattive, l'evoluzione ha permesso lo sviluppo di numerose difese antiossidanti che hanno il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno prodotto dalla controparte ossidante.

Le difese antiossidanti costituiscono un sofisticato sistema di difesa nei confronti dei ROS e possono essere sia di natura enzimatica che non enzimatica. Alcuni studi [21] hanno permesso di definire gli antiossidanti in maniera più generale come: "tutti quei composti che proteggono i sistemi biologici contro l'effetto dannoso della generazione eccessiva di ossidanti"; questa definizione è attualmente la più utilizzata.

L'omeostasi redox cellulare dipende dal bilancio tra generazione di ROS e di sistemi antiossidanti. L'equilibrio stabilito tra i due sistemi è essenziale per lo sviluppo di tutti gli organismi viventi. Difatti, tutto ciò che porta ad un'augmentata produzione di ROS o mancato funzionamento delle difese antiossidanti può essere la causa di danni irreparabili; l'impossibilità di un ripristino della condizione di equilibrio tra i due sistemi conduce le cellule a morte.

Fra gli enzimi antiossidanti si annoverano:

- la superossido dismutasi (SOD), che catalizza la conversione del superossido in H_2O_2 ;
- la catalasi (CAT), che catalizza la reazione: $2H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2H_2O$;
- la glutazione perossidasi (GPX), che catalizza la rimozione dell' H_2O_2 , formatasi dalla dismutazione del superossido, utilizzando come substrato il glutatione.

Fra gli antiossidanti non enzimatici sono compresi:

- il β -carotene;
- l'acido ascorbico, o vitamina C;
- il coenzima Q o ubiquinone;
- il glutatione (GSH);
- la vitamina E.

E' stato proposto che tali meccanismi di difesa antiossidante possano costituire una scala gerarchica che include 3 diverse fasi [22] (**Figura 1.11**):

1. eliminazione diretta e detossificazione di sostanze chimiche pro-ossidanti;
2. recupero delle proteine denaturate reversibilmente;
3. eliminazione di proteine e strutture molecolari danneggiate irreversibilmente, che rappresenterebbero un ostacolo alla sopravvivenza cellulare.

In quest'ultima fase è stata ipotizzata un'azione coordinata dell'enzima acil-peptide idrolasi (APEH) e del proteasoma (**Figura 1.11**) [22].

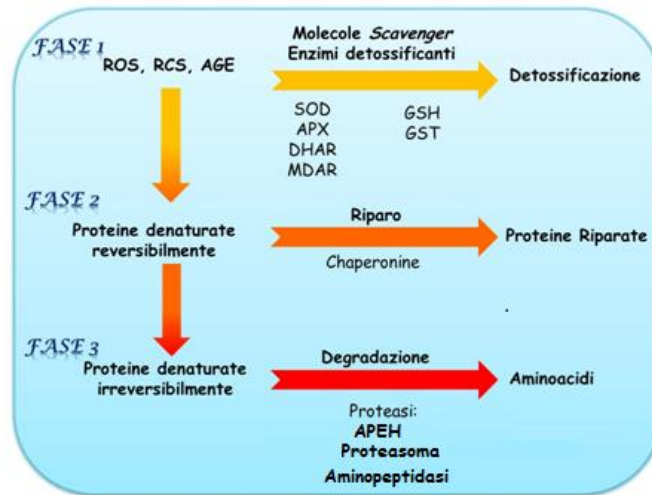


Figura 1.11. Meccanismi di difesa antiossidanti in *Arabidopsis thaliana*. Le sigle utilizzate sono: AGE, prodotti glicati finali; SOD, superossido dismutasi; APX, ascorbato perossidasi; DHAR, deidroascorbato riduttasi; MDAR, monodeidroascorbato riduttasi; GSH, glutatione; GST, glutatione transferasi; APEH, acil-peptide idrolasi.

Proteasoma e APEH sono protagonisti molto importanti nei sistemi di difesa antiossidante e il loro coinvolgimento nel catabolismo delle proteine denaturate e ossidate è il motivo per cui, negli ultimi anni, è aumentato l'interesse a studiare questi sistemi molecolari per comprenderne le implicazioni in molte malattie [23]. Proteinopatie, disfunzione mitocondriale e stress ossidativo sono le caratteristiche cardinali dei disturbi neurodegenerativi, e recenti evidenze hanno supportato il collegamento incrociato tra metabolismo energetico e neurodegenerazione [24]; per questo molti studi si stanno concentrando sulla manipolazione metabolica come possibile strumento terapeutico nella prevenzione e nel trattamento delle malattie neurodegenerative [25].

1.2.1 Il complesso ubiquitina proteasoma ed il suo coinvolgimento nei meccanismi di catabolismo proteico

Per mantenere una corretta funzionalità e vitalità cellulare, molte proteine sono soggette ad alti gradi di regolazione e *turnover*. Per realizzare questo, le proteine *unfolded*, ossidate o danneggiate, vengono riconosciute ed eliminate. La rimozione proteica avviene mediante degradazione proteolitica.

Uno dei più importanti sistemi proteolitici intracellulari è rappresentato dal complesso del proteasoma, ritrovato in archaea, in batteri, fino agli organismi superiori, vegetali ed animali [26].

Il proteasoma 26S (**Figura 1.12**) rappresenta un complesso multicatalitico, costituito da un gran numero di subunità, presente sia nel citosol che nel nucleo [27].

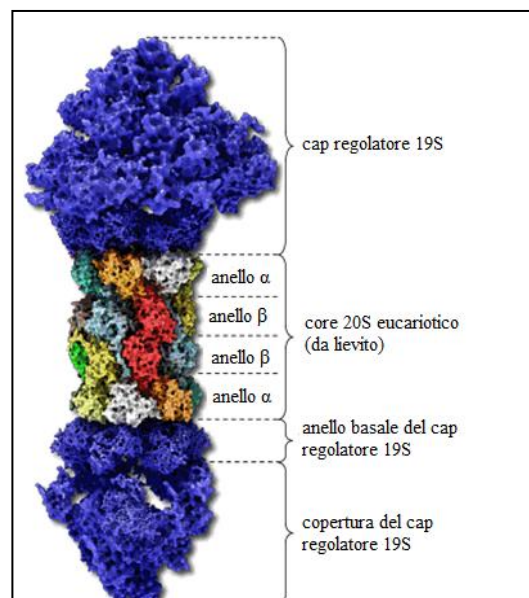


Figura 1.12. Modello di struttura terziaria del proteasoma 26S eucariotico (analizzato mediante cristollografia ai raggi X dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*).

Assolve numerose funzioni: rimozione di proteine *misfolded* o assemblate in modo anomalo, degradazione delle cicline, coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, trasformazione e degradazione dei regolatori di trascrizione, interviene nella risposta immunitaria cellulo-mediata, nell'arresto del ciclo cellulare e durante l'apoptosi [28, 29].

Questo multicomplesso è costituito da un *core* catalitico, chiamato proteasoma 20S, inserito tra due complessi regolatori, i cap 19S [30, 31], che consentono l'apertura della cavità centrale del proteasoma 20S, attivandone la funzione proteolitica. In tal modo, la struttura del proteasoma permette una selezione stringente delle molecole da degradare. Infatti, al fine di prevenire un'incontrollata ed irregolata degradazione proteolitica cellulare, il sistema è accuratamente regolato.

Il proteasoma 20S (**Figura 1.13**) rappresenta la parte catalitica del sistema, costituendo una struttura cilindrica di 28 subunità, suddivise in quattro anelli, due esterni detti α e due interni detti β , ognuno formato da sette subunità. La struttura è organizzata in modo tale da formare due anticamere tra gli anelli α e β , e una camera centrale, a livello della quale avviene la proteolisi, tra i due anelli β . Mentre negli organismi inferiori tali subunità sono solitamente identiche, in quelli superiori non tutte le subunità α e β sono uguali tra loro.

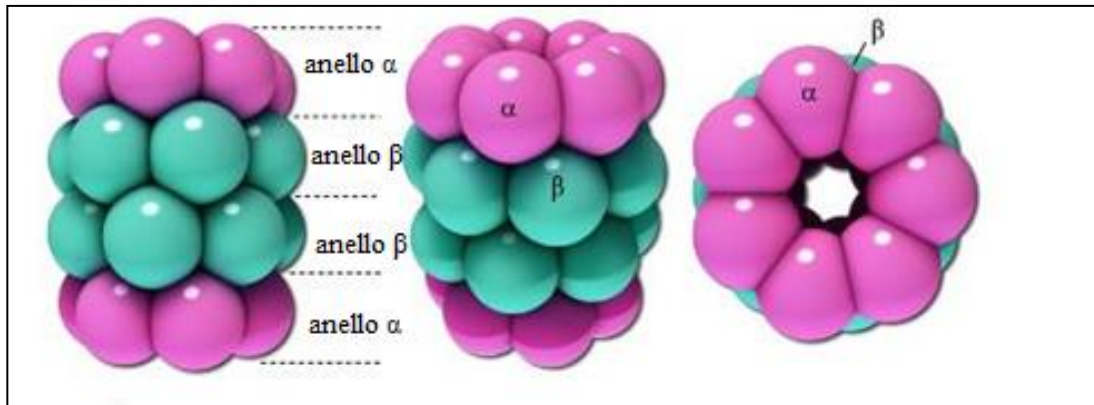


Figura 1.13. Struttura del proteasoma archaeale 20S da *Thermoplasma acidophilus*.

Gli anelli esterni, che contengono le subunità α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), non presentano attività catalitica ma sembrano avere unicamente un ruolo strutturale: stabilizzano gli anelli interni, legano le subunità regolatorie e formano un *gate* attraverso cui entrano i substrati e fuoriescono i prodotti.

Gli anelli interni, che contengono le subunità β ($\beta 1$ - $\beta 7$), vanno a costituire la camera proteolitica del proteasoma; ogni anello presenta tre siti proteolitici, associati alle subunità $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$. La catalisi che queste tre subunità operano è diversa, perché diversa è l'affinità che le rispettive subunità e i loro intorni hanno nei confronti dei substrati:

- $\beta 1$, mostra un'attività peptidil-glutamil-peptide idrolasica (PGPH), un'attività post acidica, responsabile dell'idrolisi di legami peptidici dopo residui acidi. Ad essa si attribuisce anche l'appellativo di subunità "*caspase-like*", dovuto al fatto che il taglio dopo residui di aspartato è più veloce di quello dopo residui di glutammato;

- $\beta 2$, catalizza l'idrolisi peptidica dopo residui basici e, data questa analogia con la tripsina, viene anche chiamata subunità “*trypsin-like*”;
- $\beta 5$, catalizza l'idrolisi peptidica dopo residui neutri, come quelli idrofobici ed aromatici; per questo è anche chiamata subunità “*chymotrypsin-like*”.

Gli appellativi dati alle tre subunità richiamano il nome di enzimi classici solo per quanto riguarda il substrato, e non per l'attività catalitica. Le attività dei tre siti non sono indipendenti l'una dall'altra. Quella *chymotrypsin-like*, infatti, limita le altre due in modo tale che l'attività proteolitica avvenga per cicli di attivazione e inattivazione del sito stesso. L'azione dei tre siti permette la generazione di frammenti oligopeptidici sufficientemente corti da poter fuoriuscire dal complesso. I prodotti di proteolisi hanno infatti da 3 a 26 residui, con lunghezza media di 6 amminoacidi [32-34].

Come già detto, la regolazione all'ingresso nel tunnel proteolitico del *core* 20S è realizzata dal *gate* costituito dall'anello α , che può essere presumibilmente attivato in seguito al legame di regioni idrofobiche esposte da proteine danneggiate ossidativamente con le estremità N-terminali delle subunità $\alpha 2$, $\alpha 3$, ed $\alpha 4$ [34]. Il meccanismo con cui si forma questo legame è ancora poco chiaro. Ciò che è certo è che, in seguito a danni di tipo ossidativo, le proteine espongono i loro residui idrofobici, normalmente non esposti al solvente, e sono riconosciuti dal 20S che può degradarli.

Tuttavia, il regolatore più importante del proteasoma è rappresentato dal complesso del 19S, anche conosciuto come complesso PA700, costituito da due principali strutture:

- una base a forma di anello, che si lega a sua volta alle subunità α del *core* proteosomale 20S. La base a forma di anello contiene almeno dieci differenti subunità di cui sei sono dotate di attività ATPasica, a cui è associata la funzione ATP-dipendente del proteasoma 26S, e due hanno funzione strutturale;
- un “coperchio” costituito da almeno nove subunità che riconoscono e legano le proteine poliubiquitinate, regolano l’entrata dei substrati del proteasoma 20S e determinano l’assemblaggio ATP-dipendente del 19S con il 20S.

Nello specifico, il complesso regolatore 19S permette il riconoscimento dei substrati ubiquitinati e di altri potenziali substrati, consentendo l’apertura della cavità centrale del proteasoma 20S e, contemporaneamente, la denaturazione dei substrati ubiquitinati e non, possedendo anche attività di *unfolding* (**Figura 1.14**).

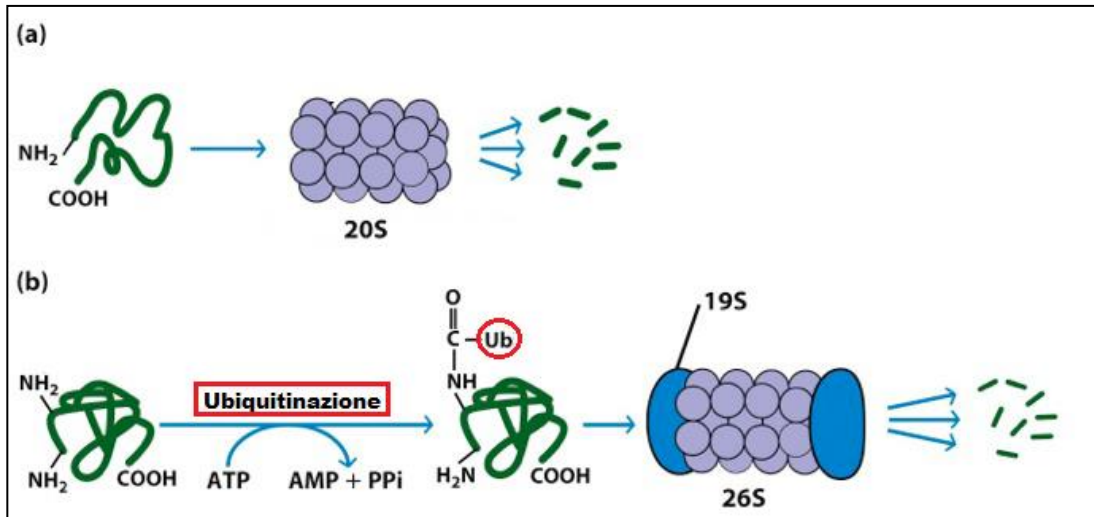


Figura 1.14. Due possibili forme in cui il proteasoma è presente all'interno delle cellule. (a) Nella forma 20S degrada proteine ossidate, danneggiate o semplicemente misfolded. (b) Nella forma 26S riconosce proteine ubiquitinate, che la cellula è pronta a degradare.

Il processo di ubiquitinazione, ATP dipendente, consiste nel legare, in modo covalente, più molecole di ubiquitina a specifici residui della proteina da degradare. L'ubiquitina è una piccola proteina globulare del peso di 8 kDa, costituita da 76 amminoacidi, molto stabile ed altamente conservata nel corso dell'evoluzione.

Le tre fasi che portano all'ubiquitinazione vedono coinvolti tre enzimi diversi (**Figura 1.15**):

1. la prima fase vede coinvolto l'enzima E1, il cui gene si indica con il nome di UBA1 e codifica per l'enzima attivatore 1 del modificatore dell'ubiquitina [35], il cui ruolo consiste nell'attivare una prima molecola di ubiquitina con un meccanismo ATP-dipendente, attraverso la formazione di un legame tioestere tra il carbossile della

glicina terminale dell'ubiquitina e un residuo di cisteina presente sull'enzima stesso;

2. la seconda fase prevede il trasferimento della molecola di ubiquitina, attivata da E1, ad una cisteina del sito attivo dell'enzima E2, attraverso un legame trans-tioesterico ad alta energia. L'enzima E2 è un enzima coniugante l'ubiquitina o, più comunemente chiamato, enzima trasportatore dell'ubiquitina, che è codificato dal gene UBE2I [36];
3. l'ultima fase richiede l'intervento dell'enzima ubiquitina ligasi, E3, che trasferisce l'ubiquitina ad un residuo di lisina sulla proteina bersaglio. Quest'ultimo enzima del processo di ubiquitinazione è codificato dal gene PRKN o PARK2 [37]; mutazioni in questo gene sono causa di un esordio precoce del PD, per questo motivo la proteina viene anche chiamata col nome di "*parkina*" [38]. È stato visto che i pazienti con mutazioni in questo gene non sviluppano corpi di Lewy e sviluppano una sindrome che ricorda la forma sporadica del PD, presentando i sintomi in età molto giovane [39].

Questo processo avviene più volte perché il legame di una singola molecola di ubiquitina non è sufficiente ad avviare una proteina alla degradazione, per cui occorre che quattro o cinque ubiquitine si leghino tra loro covalentemente. Mentre esistono pochi enzimi E1 ed E2, ce ne sono molti E3, perché ogni molecola E3 ha un suo specifico substrato e deve dirigere l'apparato dell'ubiquitinazione su una diversa proteina. Per far ciò, gli enzimi E3

hanno essenzialmente due domini che permettono loro di legare sia il substrato che l'enzima E2. Una volta ubiquitinata, la proteina è riconosciuta dal proteasoma e degradata in seguito alla de-ubiquitinazione da parte della subunità regolatoria 19S, atta a riciclare le molecole di ubiquitina. Alla fine della degradazione si ottengono una serie di peptidi di lunghezza variabile, corrispondente alla distanza dei siti proteolitici riconosciuti all'interno del proteasoma. Tutti i peptidi che derivano dalla digestione proteolitica delle proteine possono andare incontro a diversi destini: essere riciclati per costruire più velocemente nuove molecole, essere utilizzati dalle cellule immunitarie per la presentazione dell'antigene, proseguire il processo di degradazione a valle del proteasoma, grazie all'azione di una serie di peptidasi specifiche, tra cui anche l'APEH.

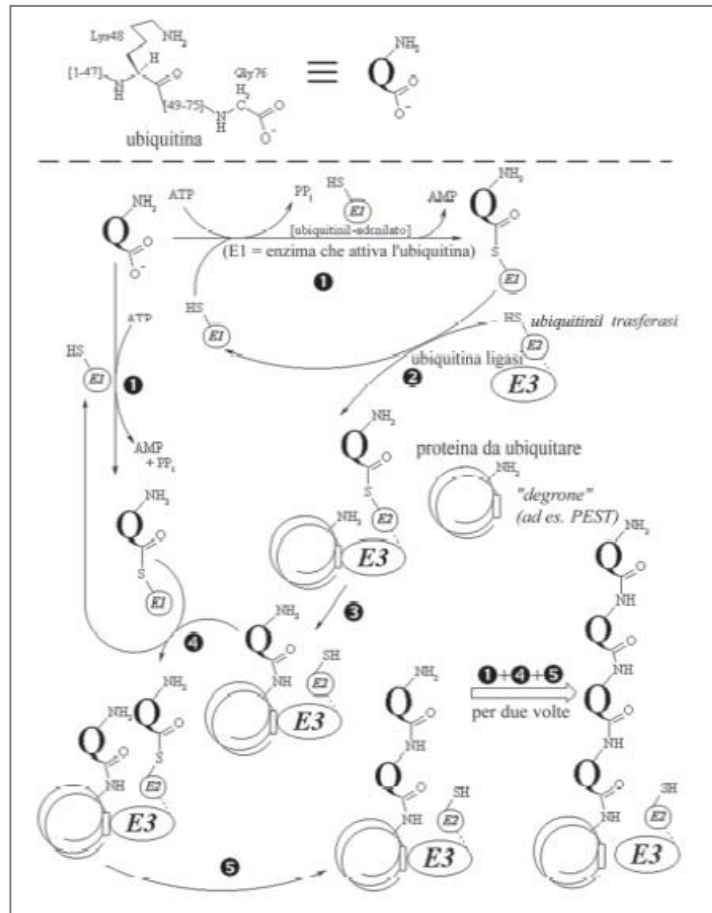


Figura 1.15. Meccanismo di ubiquitinazione e degradazione proteica mediata dal proteasoma - Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS). In alto: la molecola dell'ubiquitina contiene due gruppi importanti per la sua funzione, il gruppo carbossilico terminale e il gruppo amminico della Lys48, che sono messi in evidenza nella rappresentazione abbreviata della sequenza (gli altri residui sono indicati dall'intervallo dei numeri che ne indicano la posizione nel polipeptide). Nel resto della figura, ogni molecola di ubiquitina è simboleggiata da una Q con attaccati questi due gruppi funzionali. Il processo che coniuga l'ubiquitina a una proteina da degradare richiede di solito tre diversi enzimi. E1 è l'enzima che attiva l'ubiquitina, legandola a un proprio gruppo -SH, E2 è un enzima in grado di interagire con E1 per trasferire a un proprio gruppo -SH il residuo ubiquitile, E3 è un enzima che trasferisce l'ubiquitile dall'E2 al gruppo amminico di una lisina sulla proteina-bersaglio; per questa funzione, i vari enzimi E3 hanno struttura più complessa degli altri due tipi, contenendo siti che si associano a proteine-bersaglio specifiche o quanto meno alle loro sequenze con proprietà di degroni [40].

1.2.2 L'Acilamminoacil-peptidasi ed il catabolismo delle proteine acetilate

L'acilamminoacil-peptidasi (APEH) è un enzima appartenente alla famiglia delle prolil-oligo-peptidasi (POP), un gruppo di serin-peptidasi che differiscono dalle classiche serin-proteasi (tripsina, chimotripsina e subtilisina), poiché incapaci di idrolizzare peptidi contenenti più di 30 residui amminoacidici. Più in particolare, l'APEH è un enzima ubiquitario presente in alte concentrazioni in una grande varietà di cellule e tessuti, inclusi eritrociti, fegato e cervello. Negli organismi eucariotici l'APEH è riportata essere una proteina omotetramerica che mostra le proprietà strutturali tipiche dei membri appartenenti alla famiglia delle POP: tali enzimi presentano un dominio catalitico con un caratteristico *fold* α/β idrolasico localizzato nella regione C-terminale, in cui risiede la triade catalitica Ser-Asp-His. Inoltre, un inusuale dominio β -*propeller* nella porzione N-terminale della proteina è responsabile della selettività dell'enzima verso gli oligopeptidi. Infatti, il dominio β -*propeller* forma un tunnel che, specificamente, limita l'accesso al sito catalitico ai soli oligopeptidi ed impedisce l'ingresso alle proteine, troppo grandi per oltrepassarlo [41 – 44] (**Figura 1.16**).

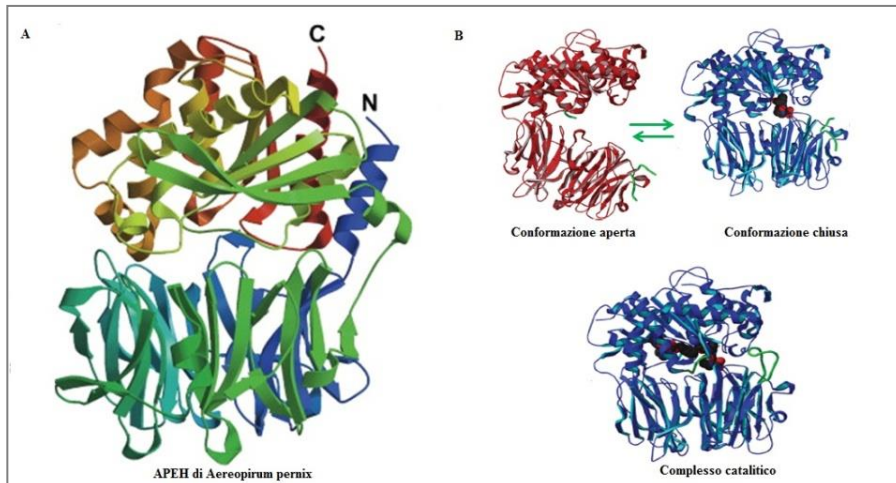


Figura 1.16. (A) Struttura dell'APEH di *Aereopirum pernix* (ceppo K1) ricavata mediante cristallografia ai raggi X. (B) Conformazione aperta e chiusa dell'APEH e complessata con il substrato specifico.

La funzione dell'APEH è unica nel suo genere, infatti questo enzima catalizza la rimozione di amminoacidi acetilati da peptidi bloccati all'estremità N-terminale, con una preferenza per alanina, metionina e serina acetilate, generando un amminoacido acetilato e un peptide più corto di un residuo amminoacidico (**Figura 1.17**).

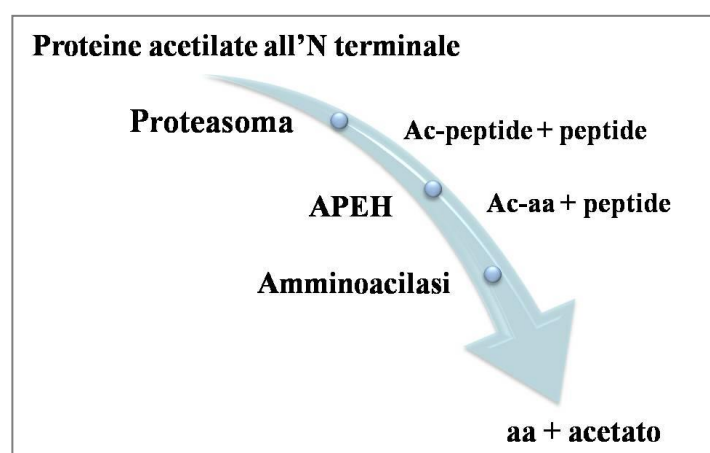


Figura 1.17. Schema di ipotesi del catabolismo delle proteine acetilate all'estremità N-terminale, che vede coinvolti proteasoma ed APEH.

Ad oggi, il ruolo biologico dell'APEH non è stato ancora del tutto chiarito; è noto che nelle cellule il 60-80% delle proteine citosoliche risultano N-acetilate ma il ruolo di questa modifica co- o post-traduzionale non è ancora conosciuto [45]; si ritiene, però, che l'N-acetilazione sia finalizzata ad una regolazione della degradazione proteica e si sta cercando di capire come l'APEH sia coinvolta nel complesso meccanismo del turnover proteico, in coordinazione con il proteasoma [46]. Come altri membri della famiglia POP, questo enzima può rappresentare un importante target per la messa a punto di farmaci di nuova generazione, essendo coinvolto nello sviluppo di differenti patologie quali quelle neurodegenerative e tumorali. A tal proposito, delezioni nella regione 21 del cromosoma 3 a livello del locus DNF15S2, dove è localizzato il gene che codifica per l'APEH, sono state riscontrate in diversi tipi di tumori solidi, compresi quello polmonare e renale [47].

I geni codificanti per i componenti del sistema UPS sono anch'essi localizzati nella regione 3p21 del cromosoma umano, suggerendo una possibile correlazione APEH/proteasoma anche a livello genico. Studi recenti hanno dimostrato che l'inibizione dell'attività dell'APEH nelle linee cellulari di neuroblastoma determina un forte evento apoptotico, confermando il coinvolgimento di questa proteasi nella sopravvivenza delle cellule eucariotiche [48]. L'APEH può svolgere un ruolo importante anche nelle malattie infiammatorie croniche, fornendo una prima linea di difesa contro risposte infiammatorie indesiderate in tessuti come l'intestino [49]. Infatti, l'intestino crasso dei mammiferi è costantemente esposto a peptidi bioattivi ed immunoreattivi N-formile, che derivano dalla degradazione proteolitica di proteine batteriche e mitocondriali [50]. Pertanto, per

prevenire una risposta immunitaria indesiderata contro i batteri commensali, i mammiferi devono possedere enzimi in grado di degradare efficacemente i peptidi N-formile, proprio come l'APEH [51, 52]. Altro ruolo dell'APEH è quello di contribuire all'eliminazione delle proteine ossidate, agendo come sistema di difesa antiossidante secondario in coordinazione con il proteasoma [53, 46]. Le proteine fortemente ossidate sono note per essere substrati poveri per il proteasoma, poiché formano facilmente legami crociati e aggregati covalenti [54]. L'APEH può svolgere un ruolo omeostatico nel sostenere il sistema antiossidante citoplasmatico e nella *clearance* delle proteine ossidate [55], contro le quali è stata dimostrata biochimicamente una sua attività endopeptidasica [56, 57]. Di fatto, l'APEH può rappresentare un promettente bersaglio terapeutico per un'ampia gamma di malattie umane collegate ad un aumento dello stress ossidativo, come il diabete mellito. Nello specifico, è stato ipotizzato che l'APEH possa avere un ruolo preventivo, o quantomeno ritardante, nello sviluppo e nella progressione del diabete mellito, grazie alla sua capacità di degradare preferenzialmente le proteine ossidate e glicate [58]. In questo contesto, è importante sottolineare che le proteine glicate, che aumentano nel diabete, non sono prontamente degradate dal proteasoma 20S [59] e che l'attività di quest'ultimo diminuisce nel diabete, mentre è stato osservato un concomitante aumento dell'attività APEH [60]. Questi eventi suggeriscono che l'APEH partecipa ad un meccanismo di difesa biologica contro lo stress ossidativo e che quindi potrebbe rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico per il trattamento di questo tipo di patologie.

Molto interesse è stato rivolto al ruolo dell'APEH nelle malattie neurodegenerative come l'Alzheimer. È stato riportato che l'APEH cerebrale da *Sus scrofa* è implicato nei processi di plasticità sinaptica, che sono responsabili della mediazione degli effetti cognitivi indotti da composti chimici come gli organofosfororici. Pertanto, questo enzima è stato proposto come bersaglio non colinergico alternativo nel trattamento delle malattie neurodegenerative [61]. Studi su ratti adulti hanno inoltre permesso di osservare che l'APEH è localizzata in alte concentrazioni nelle giunzioni sinaptiche, preferenzialmente nelle giunture pre-sinaptiche [62]. Uno studio del 2009 ha anche dimostrato che l'APEH è attiva contro monomeri ed oligomeri del peptide β amiloide [63].

Ad oggi, sono state varie le evidenze che hanno visto coinvolta l'APEH, insieme al proteasoma, nel mantenere e regolare l'omeostasi proteica cellulare; in uno studio di *crosslinking* proteico, in seguito a lisi cellulare, è stato anche visto che questi due complessi sono spazio-temporalmente associati all'interno della cellula, ipotizzando un coinvolgimento di entrambi nelle stesse *factory* proteiche cellulari [64].

È riportato che ubiquitinazione ed acetilazione sono due modifiche post traduzionali che regolano e stabilizzano la concentrazione proteica cellulare, e spesso una esclude l'altra. L'N-acetilazione avviene ad opera di enzimi chiamati N-acetiltrasferasi (NAT); tali enzimi spesso competono con il meccanismo di ubiquitinazione a seconda della composizione amminoacidica della proteina oggetto della modifica [65], così come mostrato in **figura 1.18**.

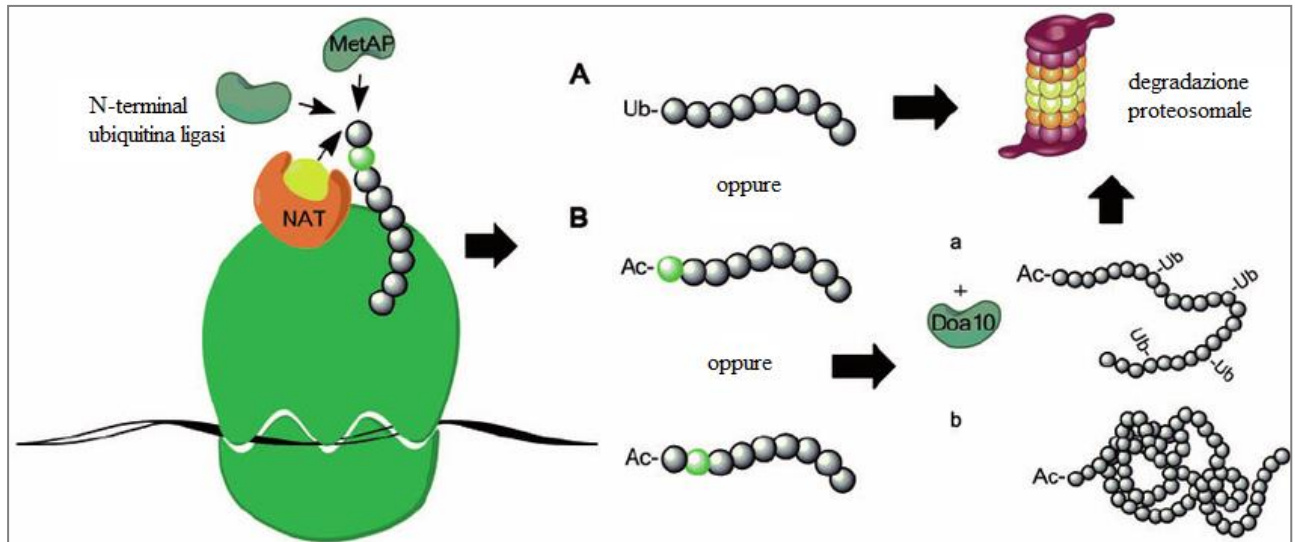


Figura 1.18. L'acetilazione all'N-terminale può regolare la degradazione delle proteine. L'acetilazione N-terminale delle proteine può avere effetti diversi sulla stabilità delle proteine. (A) Le proteine possono essere ubiquitinate N-terminalmente e successivamente degradate. L'acetilazione N-terminale può prevenire l'ubiquitinazione N-terminale e quindi aumentare la stabilità delle proteine. (B) L'amminoacido iniziatore metionina di ogni proteina può essere N-acetilato, ma quando il secondo amminoacido (in verde) è piccolo, questo permette la rimozione dell'iniziatore metionina da parte di una metionina aminopeptidasi e successiva acetilazione N-terminale. L'acetilazione N-terminale può favorire la degradazione come destabilizzante secondario residuo e viene riconosciuto dall'ubiquitina ligasi (Doa10) che porta alla degradazione proteasomale del substrato NAT ubiquitinato (a), oppure la proteina N-acetilata può essere ripiegata e rimanere stabile nella cellula (b).

È probabile che il ruolo dell'acetilazione all'N-terminale differisca a seconda del substrato proteico. Nell'uomo sono state identificate sei complessi enzimatici NAT (NatA – NatF). Nat A è il principale complesso NAT e modifica circa il 40% di tutte le proteine umane acetilate. NatA è formato da una subunità catalitica, codificata dal gene NAA10 (ARD1), e una subunità ausiliaria codificata dal gene NAA15 [66 - 68] (**Figura 1.19**).

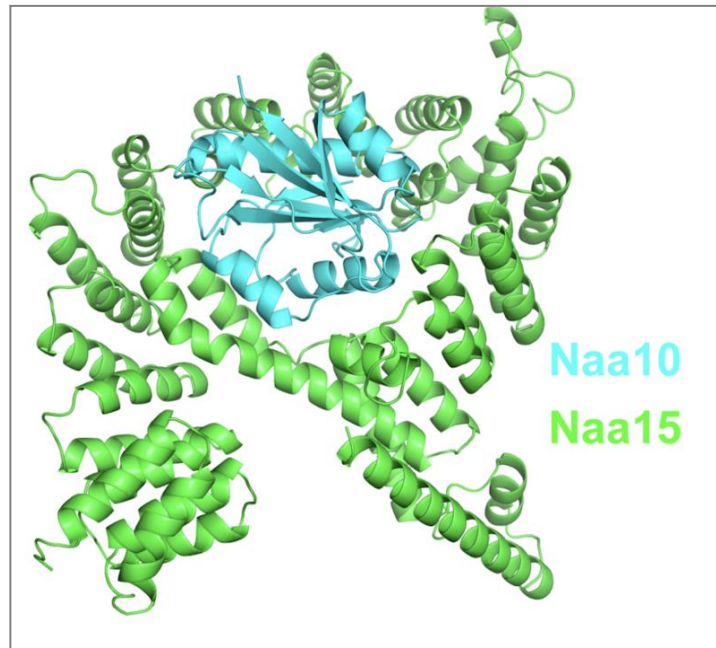


Figura 1.19. Struttura del cristallo del complesso NaaA (Naa10 e Naa15) da *Schizosaccharomyces pombe*. Le catene verdi rappresentano la subunità ausiliaria Naa15 e le catene ciano la subunità catalitica Naa10 [68] (ID PDB: 4KVM).

Un altro importante enzima coinvolto nel catabolismo delle proteine acetilate è l'amminoacilasi 1 (Acy1) (**Figura 1.20**), un enzima presente in tutte le cellule e che è attivo nel riciclo degli amminoacidi acetilati all'N-terminale che provengono dalla degradazione proteica. Si pensa che questo enzima agisca a valle dell'APEH (come ipotizzato nello schema in **figura 1.17**).

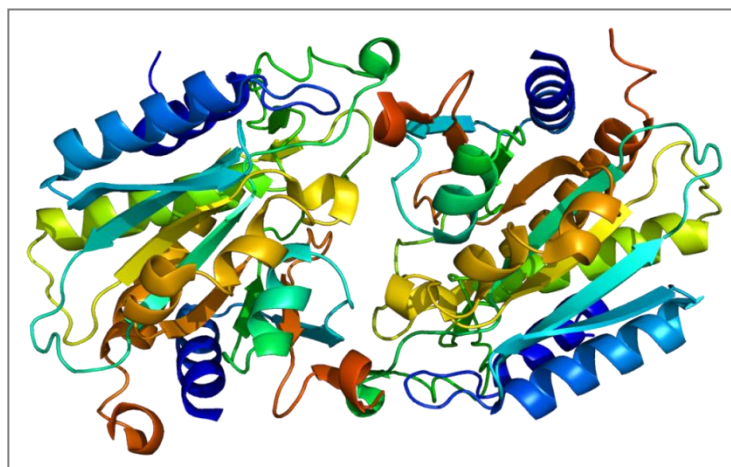


Figura 1.20. Struttura del cristallo della proteina Acy1, modellato utilizzando PyMOL (ID PDB:1Q71). L'enzima è un omodimero caratterizzato da un dominio legante lo zinco.

Anche il gene che codifica per questo enzima, così come quelli che codificano per l'APEH e per il complesso proteasomale, è localizzato nella regione 3p21 del cromosoma 3 umano; studi abbastanza datati sostengono l'esistenza di una relazione genetica tra l'APEH e l'amminoacilasi 1, vista l'omologia delle loro sequenze [69]. L'Acy1 mostra un dominio legante lo zinco ed è coinvolta in *pathways* metabolici importanti, in coordinazione con il complesso UPS e l'APEH [70, 71].

1.3 Biomarcatori per la diagnosi delle malattie neurodegenerative

Ad oggi, molti sono gli studi mirati alla ricerca di biomarcatori specifici per la diagnosi di disturbi neurodegenerativi, spesso molto difficile e che può essere raggiunta solo in presenza di un reperto istopatologico, quindi solo dopo la morte del paziente. Tra le varie analisi diagnostiche per AD e PD ci sono: studi di *imaging* cerebrale mediante risonanza magnetica (MRI), tomografia ad emissione di positroni (PET) ed analisi delle proteine nel liquido cerebrospinale (CSF); purtroppo, tutti questi metodi sono invasivi e, qualcuno, anche molto costoso. Per questo motivo, studi recenti si sono concentrati sulla ricerca di molecole biologiche sufficientemente specifiche per poter diagnosticare in modo più semplice questi disturbi [72 - 75]. In particolare, c'è un grande interesse nell'individuare nuovi biomarcatori nei fluidi corporei periferici. Questo perché i biomarcatori presenti nel sangue sono clinicamente utili, grazie ai molteplici ruoli che gli eritrociti svolgono in un'ampia varietà di processi fisiologici. Secondo la definizione del *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group*, del 1998, un marcatore biologico è “una caratteristica oggettivamente misurata e valutata come indicatore di processi biologici normali, processi patologici o risposte farmacologiche ad un intervento terapeutico” [76]. In medicina i biomarcatori possono essere usati da soli o in combinazione tra loro, per valutare lo stato di salute o di malattia di un individuo. Molti biomarcatori sono relativamente facili da misurare e fanno parte degli esami medici di routine: ricordiamo tra gli altri la misurazione della pressione arteriosa, la colesterolemia, la glicemia, mentre per alcuni di loro, soprattutto per quelli neurologici, è necessario ricorrere ad esami invasivi.

Un buon biomarcatore deve possedere alcune caratteristiche base, quali:

- avere una correlazione specifica con la malattia;
- offrire la possibilità di effettuarne la determinazione con precisione e in tempi brevi;
- essere relativamente insensibile ad errori di campionamento.

Inoltre, i biomarcatori impiegati nel processo di sviluppo dei farmaci possono essere di vario tipo:

- *diagnostico*, per una caratteristica che distingue un individuo in base alla presenza o all'assenza di uno specifico stato fisiologico, fisiopatologico o di una malattia.
- *prognostico*, per una caratteristica di base che distingue i pazienti per grado di rischio di insorgenza della malattia o in base alla progressione di un aspetto specifico della malattia. Fornisce informazioni sulla storia naturale della patologia di un particolare paziente, in assenza di un intervento terapeutico. Può essere usato come strategia di arricchimento per selezionare i malati che potrebbero presentare risultati clinici interessanti o progredire rapidamente.
- *predittivo (o di risposta)*, per una caratteristica che distingue i pazienti sulla base della loro probabilità di risposta a un particolare trattamento rispetto a nessun trattamento. Può essere utilizzato come strategia di arricchimento

per identificare una sottopopolazione che potrebbe avere una risposta specifica a una terapia (favorevole o sfavorevole).

- *farmacodinamico (o d'attività)*, è quel valore il cui cambiamento rivela una risposta biologica nel paziente sottoposto a intervento terapeutico, e per cui la misura del cambiamento è considerata pertinente alla risposta. Un biomarcatore farmacodinamico può fornire informazioni su uno specifico trattamento o, in modo più ampio, su come la malattia risponde.

Il contesto clinico specifico può incidere sull'utilizzo e sull'interpretazione di un biomarcatore, che può essere impiegato come indice di sicurezza per segnalare la tossicità, o, in un diverso contesto, per monitorare l'effetto desiderato (ad esempio, la pressione sanguigna, la velocità di filtrazione glomerulare, i lipidi sierici). Questi biomarcatori sono spesso utilizzati durante gli studi di fase II per comprendere meglio come impiegare un farmaco e guidare nella scelta della dose o del regime da testare negli studi di fase III. Dopo una lunga pratica, una conoscenza sufficiente di un particolare disturbo clinico e del ruolo di un biomarcatore possono far sì che quest'ultimo venga utilizzato come *endpoint* surrogato [77 - 79].

1.3.1 Biomarcatori da sangue

In ambito neurologico il filo conduttore delle malattie neurodegenerative è la carenza di biomarcatori utili per una diagnosi precoce e che aiutino anche a determinare la progressione della malattia ed il successo degli interventi terapeutici; vi è inoltre la mancanza di biomarcatori clinici per identificare individui a rischio durante la fase

iniziale. La loro ricerca risulta essere un punto di partenza per l'identificazione di un valido metodo di diagnosi e prevenzione, nel tentativo di associare queste malattie a difetti metabolici, il cui trattamento potrebbe ritardare lo sviluppo e la progressione della malattia. Come già accennato, sono molti gli studi che hanno come scopo l'identificazione di biomarcatori nei fluidi corporei periferici, facili da analizzare, come per esempio il sangue. Il punto di partenza di questi studi è spesso focalizzato sulla comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base di queste malattie e la ricerca di marcatori biologici da sangue risulta clinicamente utile a causa dell'importante ruolo che le sue cellule svolgono in una varietà di processi fisiologici, nonché alla facilità di disponibilità dei campioni biologici da analizzare, all'analisi senza rischio di complicazioni e all'impiego degli stessi per eventuali screening della malattia in studi di popolazione.

Essendo PD e AD "malattie conformazionali" caratterizzate dall'abbondanza di proteine *misfolded*, che portano alla formazione di aggregati proteici dannosi per le cellule nervose, possibili *biomarkers* per poter diagnosticare queste malattie sono i sistemi cellulari deputati alla eliminazione di queste proteine, quali il proteasoma, l'APEH e tutte le proteine e gli enzimi coinvolti nei *pathways* molecolari catabolici di questi due importanti complessi enzimatici.

1.4 Risultati preliminari

Il gruppo di ricerca diretto dalla dottoressa Gianna Palmieri ha condotto e pubblicato, nel 2017 [75], uno studio pilota sul sangue di 52 soggetti, composto da 26 pazienti con AD e 26 controlli sani (HC), per confrontare le attività dell'APEH e del proteasoma e metterle in relazione con la progressione della malattia, al fine di valutare se questi enzimi possono essere utilizzati come primi fattori prognostici per l'insorgenza e poi per la progressione della malattia di AD.

Lo studio ha permesso di valutare le attività enzimatiche dell'APEH (esopeptidasica ed endoproteasica) e del proteasoma (attività chimotriptica) negli eritrociti dei soggetti sottoposti ad analisi e la loro espressione genica nel sangue intero degli stessi soggetti.

I risultati di tale studio, esaminati mediante analisi statistica ANCOVA, hanno rivelato una riduzione significativa dell'attività specifica esopeptidasica dell'APEH ($p = 0.047$) e chimotriptica del proteasoma ($p = 0.027$) nei pazienti AD rispetto agli HC. Risultati simili sono stati ottenuti misurando le attività di APEH e proteasoma in campioni parzialmente purificati dell'estratto proteico totale, mediante un protocollo in *batch* (da banco), semplice e veloce, con una resina *DEAE Sepharose Fast Flow*. Nei campioni parzialmente purificati, la cui selezione era cieca, l'analisi ANCOVA ha nuovamente evidenziato una riduzione statisticamente significativa dell'attività specifica esopeptidasica dell'APEH ($p = 0.048$) ed un livello significativamente più basso dell'attività specifica chimotriptica del proteasoma ($p = 0.028$) (**Figura 1.21**, pannello A), nel gruppo AD rispetto ad HC, validando così i dati ottenuti in precedenza dagli

estratti di proteine totali. Una significativa correlazione tra attività specifiche dell'APEH e del proteasoma negli emolisati è stata trovata solo nel gruppo HC, suggerendo che la relazione funzionale dei due enzimi coinvolti nel processo di degradazione potrebbe essere compromessa nei pazienti affetti da AD.

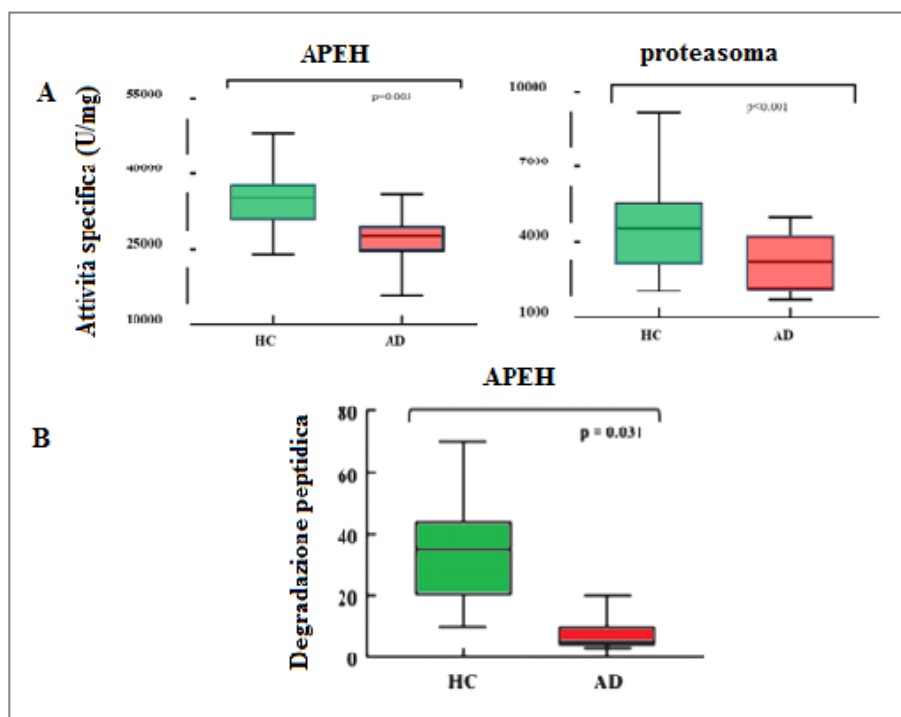


Figura 1.21. (A) Attività specifica esopeptidasica dell'APEH e chiotriptica del proteasoma misurate nei campioni enzimatici parzialmente purificati in AD e HC. I diagrammi a scatola mostrano la differente attività specifica (U/mg) dell'APEH e del proteasoma tra i pazienti malati di AD e gli HC. (B) Attività dell'OPeH misurata nei campioni enzimatici purificati da HC e AD. L'APEH purificata dal sangue di AD e HC è stata incubata a 37 °C per 24 ore con il substrato peptidico EPS, usando la sua forma non ossidata come controllo negativo. La quantità di degradazione del peptide è espressa in percentuale.

Per capire se la patologia AD può influenzare la capacità dell'APEH di degradare i substrati ossidati, è stato selezionato un peptide modello, chiamato EPS, che riproduce un frammento di GDF11 (fattore di differenziazione della crescita 11) e può servire come sonda molecolare per monitorare l'attività endopeptidasica dell'APEH. L'EPS, sottoposto

al taglio da parte dell'APEH, genera due frammenti specifici che possono essere rilevati mediante analisi cromatografica quantitativa utilizzando una colonna *Reverse Phase - HPLC*, fornendo una misurazione diretta dell'attività OPeH (Oxidized Peptide Hydrolase) verso substrati ossidati. Pertanto, è stata eseguita la stima di OPeH nei campioni di sangue, cercando una correlazione con l'insorgenza delle malattie neurodegenerative. Sono state condotte analisi incubando l'APEH purificata da diversi soggetti con l'EPS e, parallelamente, con la sua forma non ossidata, che è stata utilizzata come controllo negativo. È interessante notare che l'analisi statistica ANCOVA ha indicato una riduzione significativa dell'attività OPeH ($p = 0,031$) nel gruppo AD rispetto agli HC (**Figura 1.21**, pannello B), misurata dal confronto dell'area del picco di EPS incubato in presenza e in assenza di enzima. In particolare, l'APEH del gruppo AD ha mostrato una blanda attività endopeptidasica verso il peptide EPS (degradazione inferiore al 10%), mentre l'enzima purificato dai pazienti sani ha mostrato una notevole attività OPeH, con una degradazione del peptide stimata di circa il 40%.

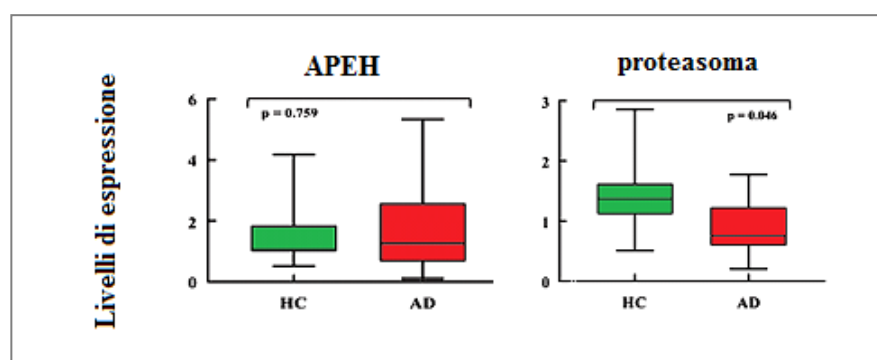


Figura 1.22. Valutazione mediante RT-PCR dei livelli trascrizionali dei geni APEH e subunità $\beta 5$ del proteasoma, in campioni di sangue AD e HC.

Per quanto riguarda le analisi di espressione genica, come mostrato in **figura 1.22**, non sono state osservate alterazioni significative del profilo di espressione del gene APEH in AD rispetto al gruppo HC ($p = 0,759$). Al contrario, l'analisi statistica ANCOVA ha rivelato una riduzione significativa dei livelli di trascrizione del gene per la subunità $\beta 5$ nei campioni di AD rispetto ai controlli ($p = 0,046$). Quindi, contrariamente a quanto osservato per il proteasoma, la riduzione dell'attività dell'APEH non è risultata associata a una diminuzione dei suoi livelli di espressione genica, suggerendo che diverse modifiche post-traduzionali, inclusa un'alterazione ossidativa del complesso enzimatico, potrebbero modularne l'attività negli eritrociti dei pazienti con AD.

2

SCOPO DELLA TESI



Il mio progetto di tesi ha avuto come obiettivo principale lo studio del ruolo dell'APEH e del proteasoma nell'insorgenza e nella progressione delle malattie neurodegenerative, in particolare del morbo di Parkinson; questa indagine fa parte di un disegno sperimentale molto più ampio, che è stato ispirato dai risultati ottenuti nello studio pilota precedentemente descritto [75]. Il progetto si è concentrato sullo studio dei due sistemi enzimatici nel sangue di pazienti affetti dal morbo di Parkinson. I pazienti in questione sono stati reclutati dal Centro per la Ricerca e la formazione in Medicina per l'Invecchiamento (CeRMI) dell'Università del Molise. Le analisi hanno riguardato lo studio dei due biomarcatori enzimatici oggetto del progetto di tesi, mediante saggi di attività effettuati spettrofluorimetricamente, in estratto grezzo, nonché analisi di espressione genica dell'APEH e proteasoma e di altri geni correlati ai *pathways* metabolici di questi due sistemi enzimatici, probabilmente coinvolti anch'essi nella malattia neurodegenerativa del morbo di Parkinson. Inoltre, basandoci su risultati discordanti da vari studi di letteratura, si è pensato di effettuare analisi di attività enzimatica dell'APEH e del proteasoma anche nelle varie componenti cellulari del sangue (eritrociti, granulociti, linfociti e monociti).

Lo scopo finale del progetto è quello di valutare la possibilità di utilizzare tali enzimi come biomarcatori facili da analizzare al fine di semplificare gli approcci diagnostici, ma più in generale questo studio contribuirà alla comprensione dei complessi meccanismi

molecolari che sono alla base della patologia di Parkinson, utili anche a possibili approcci terapeutici e prognostici.

3

MATERIALI E METODI



Questo progetto di tesi ha coinvolto tre diverse unità operative.

I partecipanti allo studio sono stati reclutati presso il Centro di Ricerca e Formazione in Medicina dell’Invecchiamento (Ce.R.M.I.) dell’Università degli Studi del Molise, diretto dal Professore Alfonso Di Costanzo. Nel laboratorio del CeRMI, diretto dalla Professoressa Antonella Angiolillo, presso il quale si è provveduti a prelevare i campioni di sangue da soggetti malati (PD) e controlli sani (HC), è stato possibile anche allestire una biobanca di ricerca utile per analisi future (analisi genetiche e metabolomiche).

Successivamente, i campioni di sangue sono stati trasportati in parte all’Istituto Nazionale Tumori (IRCCS) - Fondazione “G. Pascale” di Napoli ed in parte all’Istituto di Bioscienze e BioRisorse (IBBR) del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Napoli.

Presso l’IRCCS Fondazione “G. Pascale”, nel laboratorio della Dottoressa Rosalba Camerlingo, sono state eseguite separazioni preparative di varie frazioni cellulari del sangue (granulociti, linfociti e monociti) mediante citometria a flusso.

Le frazioni isolate sono state inviate al laboratorio dell’IBBR, diretto dal Dottore Ennio Cocca, dove sono state processate ed utilizzate per analisi enzimatiche (mediante tecniche spettrofluorimetriche) ed analisi di espressione genica (mediante Real-Time PCR quantitativa).

Nello stesso laboratorio, è stato possibile effettuare l’isolamento di campioni eritrocitari dalla restante parte dei campioni di sangue, su cui sono state eseguite le stesse analisi su menzionate, e con i quali è stata arricchita la biobanca realizzata.

3.1 Reclutamento e pratiche etiche

Lo studio ha visto coinvolti 46 soggetti, reclutati dal CeRMI e divisi in due gruppi: 23 pazienti malati di Parkinson (PD) e 23 controlli sani (HC). Tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad attenta anamnesi, esame obiettivo generale e neurologico, *Mini Mental State Examination* (MMSE), *Geriatric Depression Scale* (GDS), prelievo di sangue venoso per gli esami ematochimici e le altre analisi oggetto di questa tesi. I pazienti con MP soddisfacevano i criteri per la diagnosi di MP clinicamente definita redatti dalla *Movement Disorder Society* (MDS) nel 2015 [80]. La severità e la progressione di malattia sono state valutate attraverso l'*Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) e la scala di Hoehn and Yahr.

Lo studio è stato condotto in conformità con i principi etici enunciati nella Dichiarazione di Helsinki, nonché secondo le linee guida per la ricerca umana approvate a livello nazionale e internazionale. Il Comitato Tecnico Scientifico dell'Università degli Studi del Molise ha esaminato ed approvato questo studio e tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato scritto.

La tabella seguente riporta le principali caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti partecipanti allo studio.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio

| | CONTROLLI (n 23) | PARKINSON (n 23) |
|---|-------------------------|-------------------------|
| Maschi | 13/23 (56%) | 18/23 (78%) |
| Femmine | 12/23 (52%) | 7/23 (30%) |
| Età (media \pm DS) | 76 \pm 6.6 | 72.2 \pm 6.8 |
| Scolarità (media \pm DS) | 11.3 \pm 3.7 | 11 \pm 4.3 |
| Punteggio MMSE (media \pm DS) | 30.2 \pm 1.3 | 28 \pm 2.3 |
| Punteggio UPDRS (media \pm DS) | / | 49.4 \pm 29.4 |
| Punteggio Hoehn e Yahr (media \pm DS) | / | 2.1 \pm 0.9 |
| Punteggio GDS (media \pm DS) | 3.1 \pm 2.7 | 4.7 \pm 3 |
| BMI (media \pm DS) | 27.4 \pm 2 | 26.6 \pm 2.2 |
| Esposizione a fumo | 15/23 (65%) | 8/23 (34%) |
| Esposizione ad alcool | 13/23 (56%) | 12/23 (52%) |
| Ipertensione | 12/23 (52%) | 11/23 (47%) |
| Diabete | 3/23 (13%) | 3/23 (13%) |
| Dislipidemia | 11/23 (47%) | 8/23 (34%) |
| TIA/stroke | 1/23 (4%) | 3/23 (13%) |
| IMA | 1/23 (4%) | 2/23 (8%) |
| Farmaci antipertensivi | 11/23 (47%) | 11/23 (47%) |
| Farmaci ipoglicemizzanti | 3/23 (13%) | 3/23 (13%) |
| Farmaci ipolipemizzanti | 10/23 (43%) | 5/23 (21%) |

3.2 Realizzazione di una BioBanca di Ricerca

Ad ogni soggetto coinvolto nello studio sono stati prelevati 15 mL di sangue da usare nello studio e per la realizzazione di una biobanca, per eventuali studi futuri.

La realizzazione della biobanca ha previsto la raccolta, per ogni soggetto, delle seguenti frazioni:

- due aliquote da 3 mL in Litio/Eparina, da cui isolare varie frazioni cellulari del sangue (granulociti, linfociti, monociti ed eritrociti);
- un' aliquota da 3 mL in EDTA, per estrarre DNA ed RNA da sangue intero;
- un' aliquota da 3 mL in gel e attivatore di coagulazione, per isolare il siero;
- un' aliquota da 3 mL in Sodio\Citrato, per isolare il plasma.

Le frazioni cellulari bianche (granulociti, linfociti e monociti) sono state isolate presso l'IRCCS Fondazione "G. Pascale" mediante citometria a flusso (vedi **paragrafo 3.3**); gli eritrociti sono stati isolati presso l' IBBR del CNR di Napoli, mediante un protocollo che ha previsto l'impiego di *Ficoll Paque Plus - GE Healthcare* ®(vedi **paragrafo 3.4**).

Le aliquote di sangue prelevate in EDTA sono state ulteriormente frazionate in criotubi, adeguatamente denominati con le caratteristiche del soggetto a cui apparteneva il campione biologico e con un numero progressivo ed identificativo per la biobanca in oggetto. In particolare, sono state preparate due aliquote da 1 mL, utili per estrarre DNA, e 5 aliquote da 200 µL, per l'estrazione di RNA.

Il siero, così come il plasma, sono stati ottenuti centrifugando gli stessi vacutainer in cui è stato raccolto il prelievo di sangue, a 1500 rcf per 10 minuti in una centrifuga

Eppendorf® 5810/5810 R con rotore ad angolo fisso (FA-45-6-30). Successivamente, siero e plasma sono stati recuperati in criotubi da 5 mL, anch'essi adeguatamente denominati con le caratteristiche del soggetto a cui apparteneva il campione biologico e con un numero progressivo ed identificativo per la biobanca in oggetto.

Tutti i campioni così suddivisi sono stati conservati a -80°C per preservare l'integrità biologica delle macromolecole in essi contenute.

3.3 Citometria a flusso

La citometria a flusso è una tecnica di analisi che consente di studiare le diverse popolazioni cellulari presenti all'interno di un campione sfruttando gli antigeni di superficie o citoplasmatici espressi dalle stesse, grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi e sfruttando i parametri fisici delle cellule stesse.

La sospensione cellulare da studiare viene iniettata all'interno della cella a flusso del citometro, uno speciale capillare in quarzo sintetico al cui interno le particelle si allineano in ragione della differenza di pressione che esiste tra il fluido del campione e il fluido del liquido di trascinamento, fino a raggiungere un foro di uscita dal diametro di 50-100 μm . Le cellule, una volta allineate, attraversano individualmente un punto di interazione con il raggio luminoso del sistema di eccitazione. Il sistema di eccitazione è generalmente costituito da un raggio laser in grado di emettere luce monocromatica ed unidirezionale, di notevole intensità in determinate regioni spettrali del visibile. Solitamente vengono impiegati più laser di potenza diversa (laser blu a 488 nm, laser rosso a 633 nm) che consentono una misura efficiente dei parametri fisici e permettono di eccitare contemporaneamente diversi fluorocromi. Dall'interazione tra la luce e le cellule, per fenomeni di diffrazione, rifrazione e riflessione, vengono generati dei segnali che, elaborati da un sistema ottico, sono inviati ai relativi sensori, i fotomoltiplicatori, i quali ne misurano l'ampiezza, li convertono in segnali elettronici analogici e li inviano ad una unità di elaborazione dati, in modo che possano essere registrati ed analizzati statisticamente. Quando una cellula viene colpita dal raggio laser si sviluppano fenomeni di diffrazione della luce noti come *light scattering*. I dati di scattering vengono acquisiti

in diffusione frontale e in diffusione laterale e permettono di identificare le caratteristiche fisiche delle popolazioni cellulari. In particolare vengono valutati il *Forward Scatter* (scatter lineare o scatter a 0° gradi, FSC), che permette di studiare le dimensioni delle cellule; ed il *Side Scatter* (scatter a 90° gradi, SSC) che permette di studiare la granulosità cellulare, il rapporto nucleo/citoplasma, le irregolarità della superficie cellulare e di conseguenza la complessità della stessa. La combinazione tra i segnali *Forward Scatter* e *Side Scatter* permette di ottenere un diagramma di dispersione chiamato citogramma, all'interno del quale è possibile identificare le differenti popolazioni cellulari in base alle sole caratteristiche fisiche.

Un'ulteriore definizione cellulare si ottiene con l'introduzione dell'analisi degli anticorpi monoclonali fluorescenti. La presenza di un dato antigene (Ag) viene utilizzata come indicatore dell'appartenenza di una cellula ad una data linea cellulare, nonché del suo livello maturativo. Ogni Ag viene identificato tramite un opportuno Cluster di Differenziazione che ne esprime la distribuzione e il significato biologico. Le più importanti applicazioni della citofluorimetria sono:

- analisi immuno-fenotipica multi-parametrica, che sfrutta la capacità delle cellule di esprimere particolari marcatori che consentono di distinguere linee cellulari diverse ma anche cellule fisiologiche da forme patologiche;
- analisi del ciclo cellulare, che consente di valutare la fase del ciclo cellulare in cui si trovano le cellule in esame;
- analisi del livello di apoptosi, che utilizza l'annessina V per riconoscere i residui di fosfatidilserina esposti dalle cellule che vanno incontro ad apoptosi;

- analisi del contenuto di DNA, RNA, diversi sottotipi cellulari, organelli intracellulari;
- risposta del sistema immunitario alla somministrazione all'immunoterapia.

L'impulso che la citofluorimetria a flusso ha ottenuto negli ultimi anni è dovuto all'utilizzo di più laser, che permettono di eseguire analisi multi-parametriche, e ai nuovi fluorocromi. I fluorocromi hanno ciascuno una caratteristica lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione, e gli spettri di emissione di fluorocromi diversi spesso si sovrappongono. Di conseguenza, la combinazione dei marcatori che possono essere utilizzati dipende dalla lunghezza d'onda dei laser utilizzati per eccitare i fluorocromi e dai rivelatori disponibili. Naturalmente, molti marcatori fluorescenti aumentano il livello di complessità e richiedono una laboriosa ottimizzazione per limitare gli artefatti, nonché i complessi algoritmi di deconvoluzione per separare gli spettri sovrapposti.

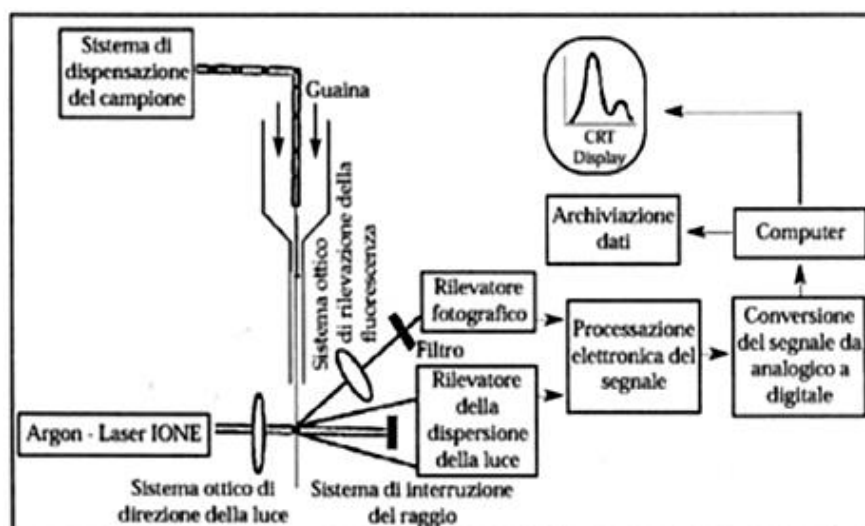


Figura 3.1. Principali componenti di un citometro a flusso.

L'impiego di anticorpi marcati con fluorocromi che emettono fluorescenza a lunghezza d'onda diversa e diretti contro una grande quantità di antigeni è utile a valutare la linea cellulare di appartenenza, il grado di differenziazione, la proliferazione e la complessità, ma anche la presenza di traslocazioni e proteine di fusione. I segnali della luce emessa dai fluorocromi sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici ed inviati ad un sistema di rivelazione costituito da fotomoltiplicatori, che li amplifica e li trasforma in impulsi elettrici e li invia ad un analizzatore che provvede alla loro trasformazione in dati.

3.3.1 Isolamento cellulare: il *Sorting*

Alcuni citofluorimetri sono definiti anche *cell sorter*. Sono caratterizzati dalla presenza di piastre di deflessione che consentono, dopo la selezione, di raccogliere fisicamente le popolazioni cellulari di interesse in base alle loro caratteristiche. Per effettuare un buon *sorting*, che porti ad ottenere una popolazione pura, è importante standardizzare cinque variabili: la velocità del flusso, la frequenza di formazione delle gocce, la posizione del punto di rottura della goccia, la frazione di tempo di ritardo e la fase di caricamento delle gocce. La purezza del *sorting* può essere inficiata dalla stabilità dei fluorocromi utilizzati per la marcatura, dall'incostanza del flusso, da una definizione inesatta delle finestre di *sorting* e dal numero di particelle analizzate e separate al secondo.

Un citofluorimetro ha la potenzialità di identificare cellule dotate di una particolare proprietà all'interno di una popolazione eterogenea. Un citometro a flusso in grado di poter effettuare il *sorting* (separazione o purificazione) cellulare è denominato *fluorescence activated cell sorter* (FACS). Nel momento in cui, ad esempio, una popolazione cellulare eterogenea viene incubata con un anticorpo monoclonale (MoAb) legato ad un fluorocromo ed in grado di interagire con uno specifico epitopo, le cellule che presentano tale epitopo e che emetteranno quindi fluorescenza in risposta all'eccitazione di un raggio laser, potranno essere purificate dalla restante popolazione. Una volta separata dalle altre cellule, la sottopopolazione potrà essere sottoposta ad esperimenti funzionali in coltura.

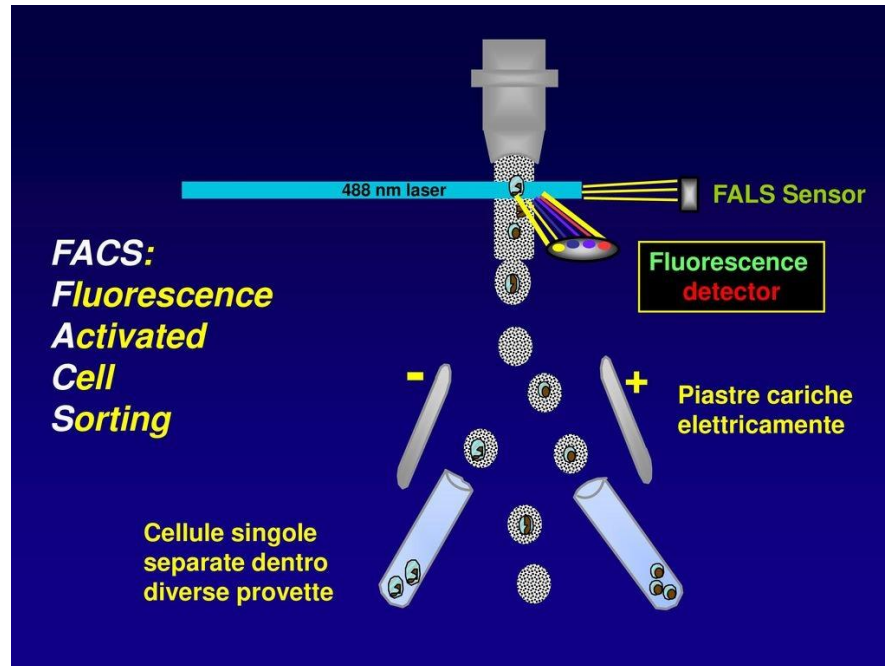


Figura 3.2. Schematizzazione del principio del sorting cellulare.

La componente cruciale che determina il processo di separazione o *sorting* cellulare è rappresentato dalla camera di *sorting*. All'apice di questa camera è posizionato un piccolo strumento in ceramica fornito di un foro centrale dotata di guarnizione, denominato *nozzle*. Attraverso la fessura, il flusso contenente la sospensione cellulare iniettata nel FACS penetra all'interno della camera di *sorting*. Attraverso le vibrazioni a determinate frequenze del *nozzle*, il flusso viene segmentato in piccole gocce (*droplets*), ciascuna contenente non più di una singola cellula derivante dalla sospensione cellulare.

Ad ogni cellula all'interno della goccia verrà o meno applicato un voltaggio tale da rendere la superficie cellulare polare, in maniera dipendente dai parametri e dalle strategie di *sorting* impostate dall'operatore (**Figura 3.2**). Il *cell sorting* consente di isolare popolazioni cellulari con elevati gradi di purezza. Sebbene sia stato descritto anche il *sorting* basato su cambiamenti elettroacustici o elettromeccanici del flusso, gli

strumenti commerciali e quelli costruiti dai laboratori di ricerca utilizzano il *droplet sorting* appena descritto. Le *droplets* contenenti le cellule selezionate, dopo essere state caricate elettricamente, vengono deflesse in provette contenenti un adeguato mezzo di coltura, mediante il passaggio attraverso un campo elettrico.

Nella **figura 3.2** è rappresentato un esempio di citogramma, ovvero un diagramma bidimensionale dove è possibile rilevare diverse popolazioni cellulari, in base alle sole caratteristiche fisiche.

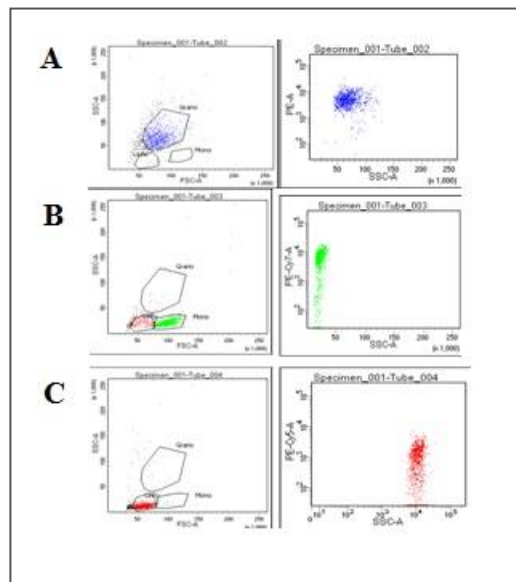


Figura 3.2. Nella figura sono rappresentati i grafici ricavati dal citometro a flusso (detti citogrammi) dopo la separazione delle varie frazioni cellulari. Nei vari esempi è possibile osservare che le diverse popolazioni si distribuiscono, in base alle loro caratteristiche fisiche, in un'area ben definita del grafico: in blu si osserva la distribuzione della popolazione dei granulociti (A); in verde la distribuzione della popolazione dei linfociti (B) ed in rosso la distribuzione della popolazione dei monociti (C).

3.4 Isolamento eritrocitario

L'isolamento degli eritrociti è stato effettuato con una metodica che ha previsto l'utilizzo di un copolimero sintetico ramificato ad alto peso molecolare e sintetizzato a partire da saccarosio e epiclordinina, utile a preparare gradienti di densità per la separazione di cellule mediante centrifugazione. In particolare, quello utilizzato per questa metodica è stato il *Ficoll Paque Plus - GE Healthcare* ®. Il *Ficoll* ® viene posizionato sul fondo di un tubo da centrifuga e il sangue (diluuito 1:2 con Buffer 1X D-PBS - *Sigma-Aldrich*) lentamente stratificato sopra di esso; successivamente si procede a centrifugare il tutto in una centrifuga *Eppendorf*® 5810/5810 R con rotore a bracci oscillanti (S-4-104), ad una velocità di 400 rcf con accelerazione 9 e decelerazione 3, per 30 minuti a 20°C. In questo modo, nei campioni saranno visibili, in strati ben definiti, le varie componenti del sangue (così come mostrato in **figura 3.3**).

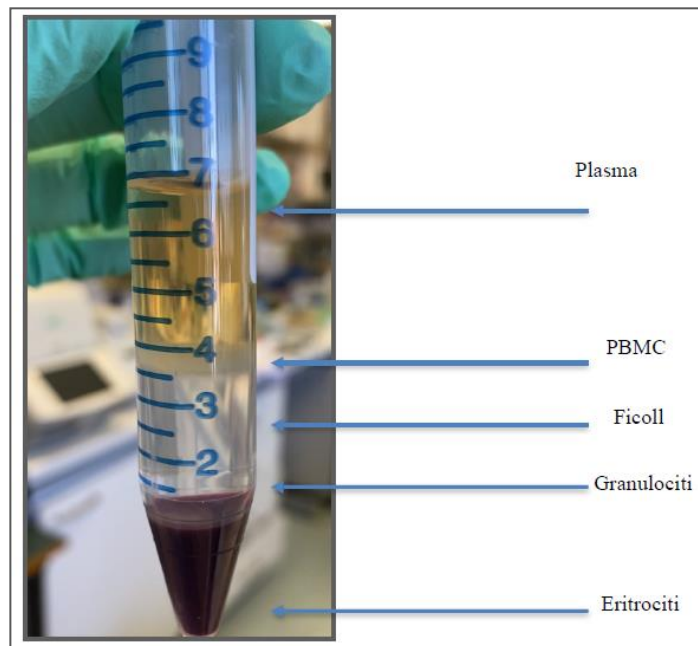


Figura 3.3. Separazione delle diverse componenti del sangue dopo centrifugazione con *Ficoll*®.

Successivamente alla centrifugata, vengono delicatamente rimosse le varie componenti del sangue per lasciare gli eritrociti sul fondo del tubo e conservarli a -80°C , fino al momento di essere processati per le analisi previste dallo studio.

3.5 Estrazione di proteine totali da sangue e frazioni cellulari del sangue

Le cellule (granulociti, linfociti e monociti) e quantità necessarie di eritrociti e sangue intero sono stati risospesi in un'adeguata quantità di tampone di estrazione per effettuare l'isolamento di proteine totali da utilizzare nelle analisi previste dallo studio descritto.

I campioni, conservati a -80°C, sono stati scongelati lentamente e poi utilizzati per l'estrazione di proteine totali.

Il tampone di estrazione è stato costituito da:

- *Hepes* 100mM;
- NaCl 150mM;
- *phenylmethylsulfonylfluoride* (PMSF) 1mM;
- NP-40 allo 0,5%.

Una volta aggiunta l'adeguata quantità di tampone di estrazione, i campioni sono stati agitati al vortex e riposti in ghiaccio per 30 minuti (eseguendo ad intervalli di 10 minuti un'agitata al vortex); successivamente sono stati centrifugati in una centrifuga *Eppendorf*® da banco ad una velocità di 11000 rcf per 45 minuti. Dopo la centrifugata il surnatante è stato recuperato ed è stato addizionato di glicerolo al 5%.

La concentrazione di proteine totali in soluzione è stata determinata mediante metodo colorimetrico quale il saggio di *Bradford*, basato sull'uso del colorante *Comassie Brilliant Blue G-250* (*Biorad*) che si lega, tramite interazioni elettrostatiche e forze di van der Waals, ai residui amminoacidici basici ed aromatici delle proteine. Il legame del colorante alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento dello stesso da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide [*Bradford, 1976*]. La quantità

di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione, pertanto l'intensità del colore blu, e dunque l'assorbimento, è proporzionale alla concentrazione proteica. Il cambiamento di colore è stato misurato allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 595 nm.

Mediante la costruzione di una retta di taratura standard, in cui è riportata l'assorbanza in funzione della concentrazione proteica, è stato possibile conoscere, per interpolazione, la concentrazione proteica dei campioni ignoti.

3.6 Saggi enzimatici mediante spettrofluorimetria

Molti saggi enzimatici fanno ricorso ad analisi spettrofluorimetriche, spesso molto più sensibili rispetto a quelle spettrofotometriche.

Le tecniche spettrofluorimetriche si basano sul fenomeno della fluorescenza. La fluorescenza è un fenomeno di emissione, in cui viene misurata la transizione all'interno di una molecola da un livello energetico superiore ad uno inferiore, rilevando la radiazione emessa anziché quella assorbita. Affinché avvenga tale transizione è necessario che in precedenza si sia verificato un evento di eccitazione, causato per esempio dall'assorbimento di radiazione elettromagnetica. La lunghezza d'onda della radiazione assorbita deve avere valori minori (energia più elevata) rispetto a quella emessa (fluorescenza). La differenza tra queste due lunghezze d'onda è nota come spostamento di *Stokes*; in generale, risultati migliori si ottengono con composti che presentano spostamenti molto ampi [81].

Gli spettri di fluorescenza danno informazioni solo su eventi che avvengono in meno di 8-10 s.

Il rapporto :

$$\phi = \text{numero di fotoni emessi} / \text{numero di fotoni assorbiti}$$

rappresenta la resa quantica, che risulta essere indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione.

A basse concentrazioni, tra l'intensità di fluorescenza (I_f) e la radiazione incidente (I_0), è valida la seguente relazione:

$$I_f = 2,3 I_0 \epsilon_{\lambda} c d \phi \quad \text{cioè} \quad I_f \text{ è direttamente proporzionale a } c$$

Dove c è la concentrazione della soluzione fluorescente (molare), d è il cammino ottico della luce nella soluzione fluorescente (cm), ϵ_λ è il coefficiente di estinzione molare del materiale assorbente alla lunghezza d'onda λ ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), infine $2,3$ è una costante.

In questo modo I_f può essere calcolato e, conoscendo I_0 , d , ϵ_λ e ϕ , possiamo ricavare la concentrazione del nostro campione [81].

La spettrofluorimetria si avvale dell'uso dello spettrofluorimetro, un apparecchio in grado di registrare gli spettri di emissione di fluorescenza. Tali spettri descrivono la variazione dell'intensità della fluorescenza in funzione della lunghezza d'onda della luce emessa.

L'attività aminopeptidasica dell'APEH è stata misurata spettrofluorimetricamente nell'estratto grezzo ottenuto dai campioni, usando l'acetil-met-7-amido-4-metilcoumarina fluorogenico (Ac-Met-AMC; *Bachem, Svizzera*) come substrato. Il rilascio del prodotto fluorescente (*7-amino-4-methylcoumarin*) è stato monitorato per 10 minuti usando uno spettrofluorimetro *Shimadzu RF-6000*, alle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente di 380 nm e 460 nm. Le miscele di reazione (800 μl) contenenti una quantità appropriata di estratto grezzo in 25 mM Tris-HCl pH 7,5, sono state preincubate a 37°C per 2 minuti. Quindi, è stato aggiunto il substrato (ad una concentrazione finale di 0,5 mM) ed è stato misurato il rilascio del prodotto.

Il substrato fluorescente sintetico N-succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarina (N-Suc-LLVY-AMC; *Sigma-Aldrich, Italia*) è stato utilizzato per effettuare i saggi dell'attività chimotriptica, per la subunità β_5 del proteasoma, nell'estratto grezzo, ad una concentrazione finale di 0,080 mM. La miscela di reazione

(800 μ l) è stata preincubata in 25 mM Tris-HCl pH 7,5 a 37°C per 2 minuti. Successivamente, è stato aggiunto il substrato N-Suc-LLVY-AMC e il rilascio del prodotto fluorescente (*7-amino-4-methylcoumarin*) è stato monitorato per 10 minuti usando uno spettrofluorimetro *Shimadzu RF-6000*, alle lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente di 380 nm e 460 nm.

Le attività enzimatiche sono state calcolate sulla base della fase lineare iniziale della cinetica, definendo un'unità di attività di enzima (U) come la quantità di enzima che rilascia 1 mol di substrato per minuto nelle condizioni standard del saggio enzimatico.

3.7 Purificazione di RNA totale ed analisi di espressione quantitativa tramite Real-Time PCR

L'RNA totale è stato isolato da campioni di sangue intero utilizzando il reagente TRIzol® LS (Ambion/Thermo Fisher Scientific, USA), progettato per il trattamento di campioni liquidi, secondo una procedura molto lunga, meticolosa e complicata.

Per l'estrazione sono stati usati 200 µL di sangue intero (per ogni campione) prelevati dalla biobanca conservata a -80°C. Il sangue è stato lasciato scongelare lentamente e successivamente, secondo protocollo, diluito 1:2 per procedere con l'estrazione di RNA totale.

Il protocollo di estrazione ha previsto quattro fasi:

1. fase di omogeneizzazione;
2. fase di separazione;
3. precipitazione dell'RNA;
4. lavaggio e risospensione dell'RNA.

Nella prima fase, a 400 µL di sangue diluito sono stati aggiunti 1,2 mL di TRIzol® LS. I campioni sono stati omogenati "pipettando" più volte fino a rendere la soluzione omogenea e, successivamente, centrifugati in una centrifuga *Eppendorf*® da banco a 12000 rcf per 20 minuti a 4°C. Al termine, il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo da centrifuga per procedere alla fase successiva.

Nella fase di separazione, al surnatante recuperato sono stati aggiunti 320 µL di cloroformio, il tutto è stato agitato per 15 secondi e, successivamente, incubato a temperatura ambiente per 15 minuti. Poi i campioni sono stati centrifugati in una

centrifuga *Eppendorf*® da banco a 12000 rcf per 20 minuti a 4°C, e al termine il surnatante (fase acquosa) è stato trasferito in un nuovo tubo da centrifuga per procedere alla fase di precipitazione dell'RNA.

Alla fase acquosa recuperata sono stati aggiunti 800 µL di isopropanolo al 100%, il tutto è stato agitato al vortex e incubato a temperatura ambiente per 10 minuti. Successivamente, centrifugato in una centrifuga *Eppendorf*® da banco a 12000 rcf per 20 minuti a 4°C. Dopo la centrifugata, il surnatante è stato rimosso ed il pellet (costituito da RNA) recuperato, per procedere al lavaggio ed alla risospensione dello stesso.

Il lavaggio del pellet è consistito nell'aggiunta di 1,6 mL di etanolo al 75%, il tutto è stato agitato al vortex e successivamente centrifugato in una centrifuga *Eppendorf*® da banco a 7500 rcf per 10 minuti a 4°C. Al termine di questo passaggio, il surnatante è stato rimosso ed il pellet è stato lasciato asciugare all'aria e poi risospeso in 20 µL di *H₂O nuclease free*, trattata con dietilpirocarbonato (DEPC); successivamente il tutto è stato incubato in un bagnetto termostato a 55°C per 5 minuti per facilitare la risospensione dell'RNA.

La determinazione della concentrazione dell'RNA estratto è stata effettuata mediante l'uso del fluorimetro *Qubit Fluorometer TM (Invitrogen, Molecular Probes, USA)*, uno strumento che permette di misurare la concentrazione di macromolecole come dsDNA, ssDNA o RNA, tramite l'interazione con sonde intercalanti in grado di emettere fluorescenza solo quando si legano alle loro molecole bersaglio. Lo strumento è stato calibrato con il *Quant-iT RNA Assay kit, 100* (range del dosaggio tra 0,2-100 ng; campione di partenza con concentrazione compresa tra 10 pg/µl-100 ng/ml) il quale

fornisce due standard necessari per la costruzione della curva di lavoro. Per ciascun campione di RNA da analizzare è stata aggiunta una data quantità di *Quant-iT™ Working Solution*, contenente la sonda fluorescente, tale da ottenere un volume finale pari a 200 µl. Dopo un'incubazione di 2 minuti, a temperatura ambiente, è stato possibile effettuare le misurazioni.

Gli RNA sono stati quindi retro-trascritti per ottenere il cDNA, utilizzando il sistema *Super Script® VILO™ Master Mix* (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, USA) costituito da un premiscelato contenente in un tubo tutto il necessario per la trascrizione inversa quali: inibitori delle ribonucleasi, miscela di *random primers*, MgCl₂, dNTPs e la trascrittasi inversa.

Per ogni singola reazione sono stati aggiunti in un tubo: 4 µl di *Super Sript VILO Master Mix*, una quantità di RNA corrispondente a 2 µg e H₂O DEPC, fino al raggiungimento di un volume totale pari a 20 µl (**Tabella 1**). La trascrizione inversa è stata eseguita in una *Eppendorf Mastercycler Personal*, utilizzando il seguente programma:

- 10 minuti a 25 °C;
- 60 minuti a 42 °C;
- 5 minuti a 85 °C per bloccare la reazione.

Tabella 1. Composizione della miscela di reazione con la trascrittasi inversa.

| Componenti | Volume |
|---------------------------------|----------|
| SuperScript VILO MasterMix | 4µl |
| RNA (2µg) | Xµl |
| H ₂ O DEPEC-trattata | 20-4 Xµl |
| | 20µl tot |

Diluizioni in serie del cDNA sono state usate per calcolare l'efficienza dei *primers*. I *primers* sono stati progettati utilizzando l'"*Universal Probe Library Assay Design Center*", disponibile al seguente link:

https://lifescience.roche.com/en_it/CategoryDisplay?catalogId=10001&ta=AssaDesign+Center&identi%25EF%25AC%2581er=Universal+Probe+Library&langId=-1#tab-3

I *primers* utilizzati nei test sono elencati nella **Tabella 2**.

Tabella 2. *Primers usati per l'analisiqPCR.*

| GENE | NOME PRIMERS | SEQUENZA NUCLEOTIDICA |
|--------|--------------|----------------------------------|
| ACTINA | ACTINA_left | CCA ACC GCG AGA AGA TGA (18) |
| | ACTINA_right | CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG (20) |
| SOD2 | SOD2_left | AAT CAG GAT CCA CTG CAA GG (20) |
| | SOD2_right | TAA GCG TGC TCC CAC ACA T (19) |
| PARK1 | PARK1_left | GTG GCT GCT GCT GAG AAA A (19) |
| | PARK1_right | ACT CCC TCC TTG GTT TTG GA (20) |
| UBA1 | UBA1_left | CAG ACA TGG ACA CCA TTG AGA (21) |
| | UBA1_right | GCA GCC GTG TCA GAC TTT AAC (21) |
| UBE2I | UBE2I_left | AGG GAA GTC CCG AGA CAA AG (20) |
| | UBE2I_right | TCC CCG ACA TGT TCA AAG TC (20) |
| PRKN | PRKN_left | GGAGCTGAGGAATGAGTGGA (20) |
| | PRKN_right | ACAATGTGAACAATGCTCTGCT (22) |
| BETA 5 | BETA 5_left | CAT GGG CAC CAT GAT CTG T (19) |
| | BETA 5_right | GAA ATC CGG TTC CCT TCA CT (20) |
| APEH | APEH_left | CCC CAT TCA TCC TTT GTC AC (20) |
| | APEH_right | AAA GCC CAT CTT GCA AAG C (19) |
| ACY1 | ACY1_left | CAG CGA CAG GAG AGT GAG C (19) |
| | ACY1_right | GAA GAG CGT CAC CGA TGG (18) |
| NAA10 | NAA10_left | AGC GGG ACC TCA CTC AGA T (19) |
| | NAA10_right | CTC CAC CTT GTT CTC GAT GG (20) |

le analisi sono state eseguite su un *CFX96 REAL-TIME SYSTEM®* (Bio-Rad, USA) (**Figura 3.4**) con una concentrazione dei *primers*, specifici per ogni gene di interesse, di 300 nM, *iTaq™ Universal SYBR®Green Supermix* (Bio-Rad, USA) e con un programma che ha previsto le seguenti fasi:

- una fase di attivazione della polimerasi e di denaturazione del DNA, che ha previsto un ciclo a 95°C per 3 minuti;
- una fase di amplificazione, a sua volta divisa in due fasi, ripetute per 40 volte, consistenti in un ciclo di denaturazione a 95°C per 15 secondi ed un ciclo di *annealing* ed *extension* a 60°C per 40 secondi, impostando anche la lettura della piastra per l'emissione del segnale di amplificazione;
- un'ultima fase, quella di *melting*, con un intervallo di temperatura da 65°C a 95°C (con un incremento di 0,5°C per ciclo di 5 secondi) e successiva lettura della piastra per l'emissione del segnale e la rilevazione della curva di *melting*.



Figura 3.4. *CFX96 REAL-TIME SYSTEM®* (Bio-Rad, USA).

I livelli di espressione del gene della β -actina sono stati usati come controllo interno per la normalizzazione. I valori di Ct ottenuti per i geni target sono stati confrontati con i valori di Ct ottenuti per la β -actina (gene di riferimento).

I livelli di espressione genica sono stati calcolati mediante la seguente equazione:

$$R = (E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}$$

(Formula di Pfaffl)

La formula di Pfaffl [82] permette una stima migliore dei livelli di espressione in quanto introduce nel calcolo le efficienze delle coppie dei primers utilizzati nell'analisi. Le coppie di primers vengono controllate proprio mediante la stima della loro efficienza di amplificazione: soltanto quelle che presentano valori di efficienza nell'intervallo 85–115 % possono essere “validate” per l'impiego nell'analisi Real-Time.

I livelli di espressione vengono poi calcolati come media di misure effettuate in triplicato.

3.8 Analisi statistiche

I dati sono stati analizzati mediante un calcolatore *online* (<https://www.socscistatistics.com>) di analisi statistica.

Sono stati eseguiti due test statistici:

- t-test per campioni indipendenti;
- ANOVA ad un fattore.

Il t-test viene utilizzato quando si osserva una variabile numerica (ad esempio l'altezza) e si confrontano le medie di due popolazioni o gruppi separati (ad esempio maschi e femmine). In questo caso, questo semplice calcolatore fornisce tutti i dettagli del calcolo del t-test, inclusa la media campionaria, la somma dei quadrati e la deviazione standard.

I requisiti per questo test sono:

- due campioni indipendenti;
- i dati dovrebbero essere distribuiti normalmente;
- i due campioni dovrebbero avere la stessa varianza.

Il test ANOVA ad un fattore per misure indipendenti è progettato per confrontare le medie di tre o più campioni indipendenti (trattamenti) contemporaneamente.

Per entrambi i test è stato impostato un livello di significatività $p < 0.05$.

4

RISULTATI E DISCUSSIONE



La malattia di Parkinson è caratterizzata dal fallimento globale dei sistemi di proteostasi cellulare, soprattutto a livello neuronale [17]. Ad oggi, uno dei problemi maggiori di questa patologia neurodegenerativa è quello di riuscire a fare una diagnosi precoce e certa per intervenire in tempo sul decorso della patologia stessa.

Negli ultimi anni, alcuni studi si stanno concentrando sulla ricerca e lo studio di biomarcatori da sangue al fine di usarli come elementi prognostici precoci nell'insorgenza e la progressione della malattia.

Questo studio, che si inserisce in questo filone di ricerca, ha visto coinvolti 46 soggetti, 23 pazienti PD e 23 controlli sani, per i quali sono state effettuate misure delle attività enzimatiche dell'APEH e del proteasoma nel sangue. Per un sottogruppo di questi soggetti, 13 pazienti PD e 13 controlli sani, sono state eseguite analisi enzimatiche degli stessi enzimi in varie frazioni cellulari del sangue (granulociti, linfociti, monociti ed eritrociti) ed analisi di espressione sia dei geni che codificano per l'APEH e per la subunità catalitica $\beta 5$ del proteasoma, che di altri geni collegati ai *pathways* metabolici degli enzimi oggetto dello studio (NAA10, ACY1, UBA1, UBE2I e PRKN). Per lo stesso sottogruppo sono state eseguite anche le analisi di espressione dei geni SOD2 e PARK1.

I risultati ottenuti da questo progetto di tesi sono interessanti e, seppur ottenuti da un ristretto numero di campioni, sono promettenti non solo per contribuire alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della patologia di Parkinson, ma anche utili per la ricerca di biomarcatori che ne potranno facilitare la diagnosi e/o permettere un migliore studio della patologia per possibili risvolti terapeutici.

4.1 Saggi di attività enzimatica

L'estratto proteico totale, ottenuto da campioni di sangue utilizzando un protocollo precedentemente descritto (vedi paragrafo 3.4), è stato utilizzato per misurare l'attività esopeptidasica dell'APEH e chimotriptica del proteasoma.

L'attività specifica esopeptidasica dell'APEH e quella chimotriptica del proteasoma sono state misurate usando, rispettivamente, due substrati fluorogenici:

- Ac-Met-AMC (acetilMet-7-ammino-4-metilcoumarina) per l'APEH
- N-Succ-LLVY-AMC (N-succinil-Leu-Leu-Val-Tyr- 7-amido-4 metilcoumarina) per la subunità $\beta 5$ del proteasoma.

Per entrambi i saggi, il rilascio del prodotto fluorescente 7-amino-4-methylcoumarin è stato monitorato utilizzando uno spettrofluorimetro *Shimadzu RF-6000*. Le attività sono state calcolate nella fase iniziale del rilascio a cinetica lineare e, conoscendo la quantità di proteine totali con cui è stato condotto il saggio, è stato possibile calcolare l'attività specifica degli enzimi in questione.

Tale metodo, specifico e sensibile, ci ha permesso di misurare accuratamente le attività dei due complessi enzimatici di interesse.

Per questa prima analisi sono stati usati campioni di sangue di 46 partecipanti (23 pazienti con PD e 23 controlli sani); la misurazione delle attività specifiche ha mostrato risultati interessanti, descritti nel paragrafo successivo.

4.1.1 Attività esopeptidasica dell'APEH e chimotriptica del proteasoma nel sangue intero

Come mostrato nei due grafici in **figura 4.1**, i risultati ottenuti hanno evidenziato un leggero aumento dei livelli di attività esopeptidasica dell'APEH ed un deciso aumento dell'attività chimotriptica del proteasoma nei campioni PD rispetto ai controlli sani.

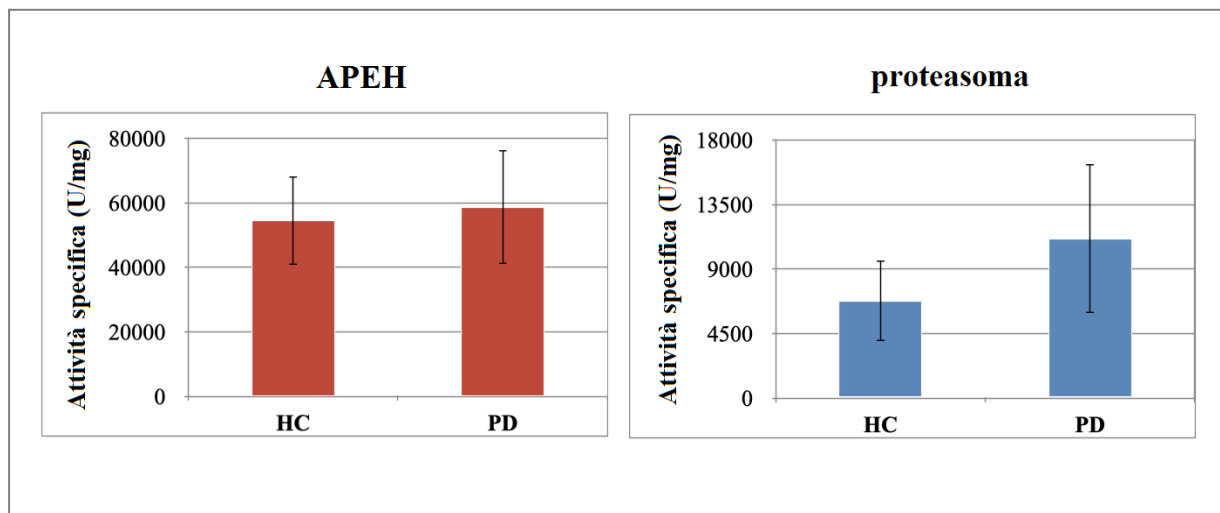


Figura 4.1. Attività specifica, da campioni di sangue intero, dell'APEH (attività esopeptidasica, grafico con istogrammi in rosso) e del proteasoma (attività chimotriptica, grafico con istogrammi in blu) in soggetti controllo sani (HC) e in soggetti malati di Parkinson (PD).

Tali risultati sono interessanti soprattutto per il sistema proteasomale: è infatti noto che la compromissione di questo sistema è sempre più legata alla patogenesi delle malattie neurodegenerative, in particolare del Parkinson e dell'Alzheimer. Prove sperimentali dimostrano che, quando vi è una riduzione dell'attività di questo complesso proteolitico, viene favorito l'accumulo intracellulare di aggregati citotossici che aumentano la

vulnerabilità a stimoli proapoptotici [83 – 87]. Inoltre, un'alterata attività del complesso proteasomale è stata riscontrata in studi effettuati *post mortem* su cervelli di pazienti PD ed AD. In particolare, una ridotta attività proteasomale è stata rilevata nella *substantia nigra* di pazienti affetti da PD sporadico [88, 89], mentre è stata osservata un'attività elevata nella corteccia temporale e nell'ippocampo di pazienti AD [90, 91].

È chiaro che, a seconda dello stato in cui i pazienti si trovano, questo complesso può essere più o meno compromesso, più o meno alterato e presentare una ridotta o aumentata attività. Inoltre, è stato visto che il sistema UPS può essere o meno coinvolto nella progressione della malattia di Parkinson anche a seconda dell'età dei pazienti [92].

Studi rivolti all'identificazione di potenziali biomarcatori da liquidi periferici, ad esempio dal sangue e dalle cellule che lo compongono, hanno evidenziato una chiara riduzione dell'attività del proteasoma in linfociti di pazienti PD in trattamento farmacologico rispetto a soggetti sani, mentre per pazienti PD non trattati è stata riscontrata un'attività simile rispetto a quella osservata in soggetti sani [93]. Lo stesso studio [93] ha evidenziato che, a differenza dei pazienti PD trattati, i pazienti AD non hanno presentato alcuna differenza di attività proteasomale nei linfociti rispetto ai controlli sani. Ancora, lo studio pilota effettuato su eritrociti di pazienti AD [76], in cui è stata osservata una riduzione dell'attività proteasomale nei soggetti malati rispetto ai controlli sani, è un'ulteriore riprova della complessità dei processi che coinvolgono questi sistemi enzimatici.

Quindi, valutando i pochi studi di letteratura a riguardo, che descrivono anche fenomeni apparentemente in contrasto da quanto trovato con le nostre prime analisi, è emersa

l'importanza di studiare l'attività del proteasoma e dell'APEH nelle varie frazioni cellulari del sangue per capire, sia in soggetti sani che malati, quali fossero quelle dove tali enzimi sono più attivi; studi che potrebbero risultare ancora più interessanti proprio per la scarsa letteratura scientifica a riguardo, alla ricerca di informazioni sul coinvolgimento di questi sistemi enzimatici nelle patologie neurodegenerative come AD e PD, per migliorare la comprensione dei meccanismi molecolari in cui sono maggiormente coinvolti.

4.1.2 Attività esopeptidasica dell'APEH e chimotriptica del proteasoma in frazioni cellulari del sangue (granulociti, linfociti, monociti ed eritrociti)

Le analisi enzimatiche di seguito descritte sono state eseguite su una sottopopolazione dei soggetti coinvolti nello studio (13 pazienti PD e 13 controlli sani), considerata la complicata e costosa metodica per effettuare le separazioni cellulari delle frazioni oggetto dello studio.

Gli estratti proteici totali, ottenuti dalle frazioni cellulari utilizzando un protocollo precedentemente descritto (vedi paragrafo 3.4), sono stati utilizzati per misurare l'attività specifica esopeptidasica dell'APEH e chimotriptica del proteasoma, mediante la metodica precedentemente descritta (vedi paragrafo 3.6).

I risultati ottenuti, mostrati in **figura 4.2**, hanno messo in evidenza dei fenomeni molto interessanti.

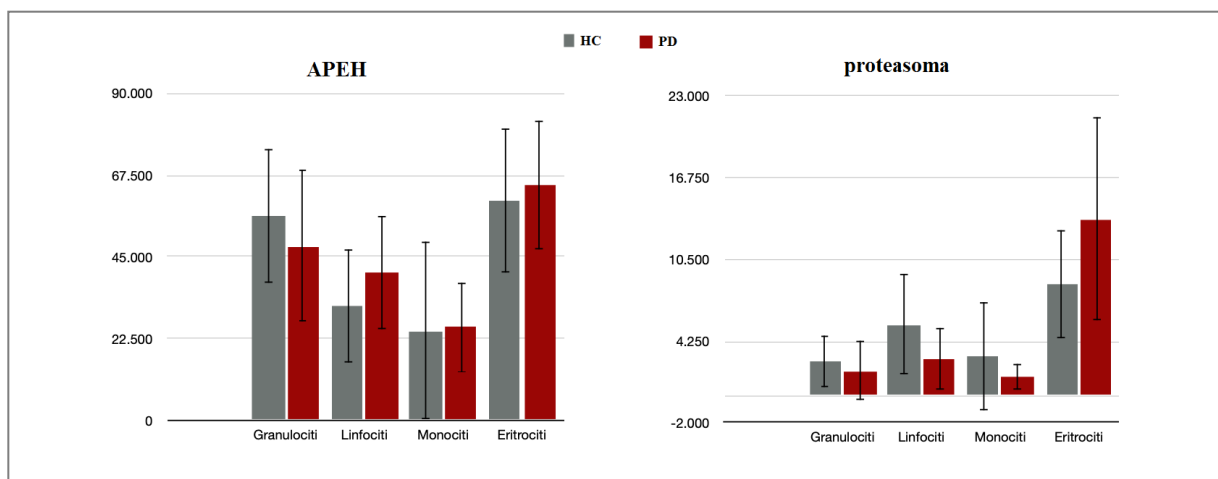


Figura 4.2. Attività specifica da frazioni cellulari del sangue (granulociti, linfociti, monociti ed eritrociti). A sinistra, l'attività specifica esopeptidasica dell'APEH. A destra, l'attività specifica chimotriptica del proteasoma. Gli istogrammi in grigio sono i risultati ottenuti per i soggetti sani (HC) ed in rosso quelli per i pazienti malati di Parkinson (PD).

Come si osserva dai grafici, le attività degli enzimi oggetto dello studio sembrano essere, per quanto riguarda gli eritrociti, quasi speculari a quello che succede nel sangue intero, riportati in **figura 4.1**. Questo fa pensare che la maggior parte delle attività di questi due complessi nel sangue è da attribuire alla componente cellulare eritrocitaria.

Anche nelle frazioni cellulari bianche si osservano fenomeni interessanti. Nei granulociti i risultati mostrano una chiara riduzione delle attività di entrambi i complessi enzimatici nei pazienti PD rispetto ai controlli sani. Nei monociti si osserva una riduzione dell'attività del proteasoma nei pazienti PD, ma l'attività dell'APEH non mostra significativa differenza tra PD ed HC.

Il risultato più interessante risulta essere il livello di attività dei due complessi nei linfociti; infatti, come è possibile notare dai grafici in **figura 4.2**, l'attività del proteasoma risulta ridotta nei pazienti PD rispetto ai controlli sani, così come riportato in alcuni studi [93, 94], mentre l'attività dell'APEH risulta aumentata negli stessi pazienti PD rispetto agli stessi controlli sani. In questo caso, è come se la perdita di attività del proteasoma, in condizioni patologiche, fosse compensata da una elevata attività dell'APEH, per sostenere l'omeostasi proteica perturbata in seguito a stress ossidativo, dovuto alla patologia stessa.

A sostegno di questi risultati sono state eseguite anche analisi di espressione genica dei due enzimi e di altri enzimi correlati ai loro *pathways* molecolari (risultati mostrati nel successivo **paragrafo 4.2**), al fine di comprendere meglio i meccanismi molecolari alla base della patologia del Parkinson.

4.2. Analisi di espressione genica

Le analisi di espressione genica sono state effettuate su una popolazione di 10 pazienti PD e 10 controlli sani. Inizialmente è stato estratto RNA totale da sangue intero (protocollo descritto nel **paragrafo 3.7**), sul quale si è poi proceduti all'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR.

Prima di effettuare le analisi di espressione genica, sono state misurate e calcolate tutte le efficienze delle coppie di oligonucleotidi (*primers*) necessarie all'esecuzione delle analisi previste. Le curve di amplificazione, ottenute da reazioni allestite con quattro diluizioni seriali di un campione di cDNA, sono state analizzate mediante il *software BIORAD® Maestro*, che ci ha permesso di ottenere una curva *standard* per ogni coppia di oligonucleotidi da cui poter ricavare i valori di efficienza da inserire nella formula di *Pfaffl* (vedi **paragrafo 3.7**).

Tutte le curve di amplificazione e le curve *standard*, con i relativi valori di efficienza, sono riportate nelle figure seguenti (**Figure 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6**).

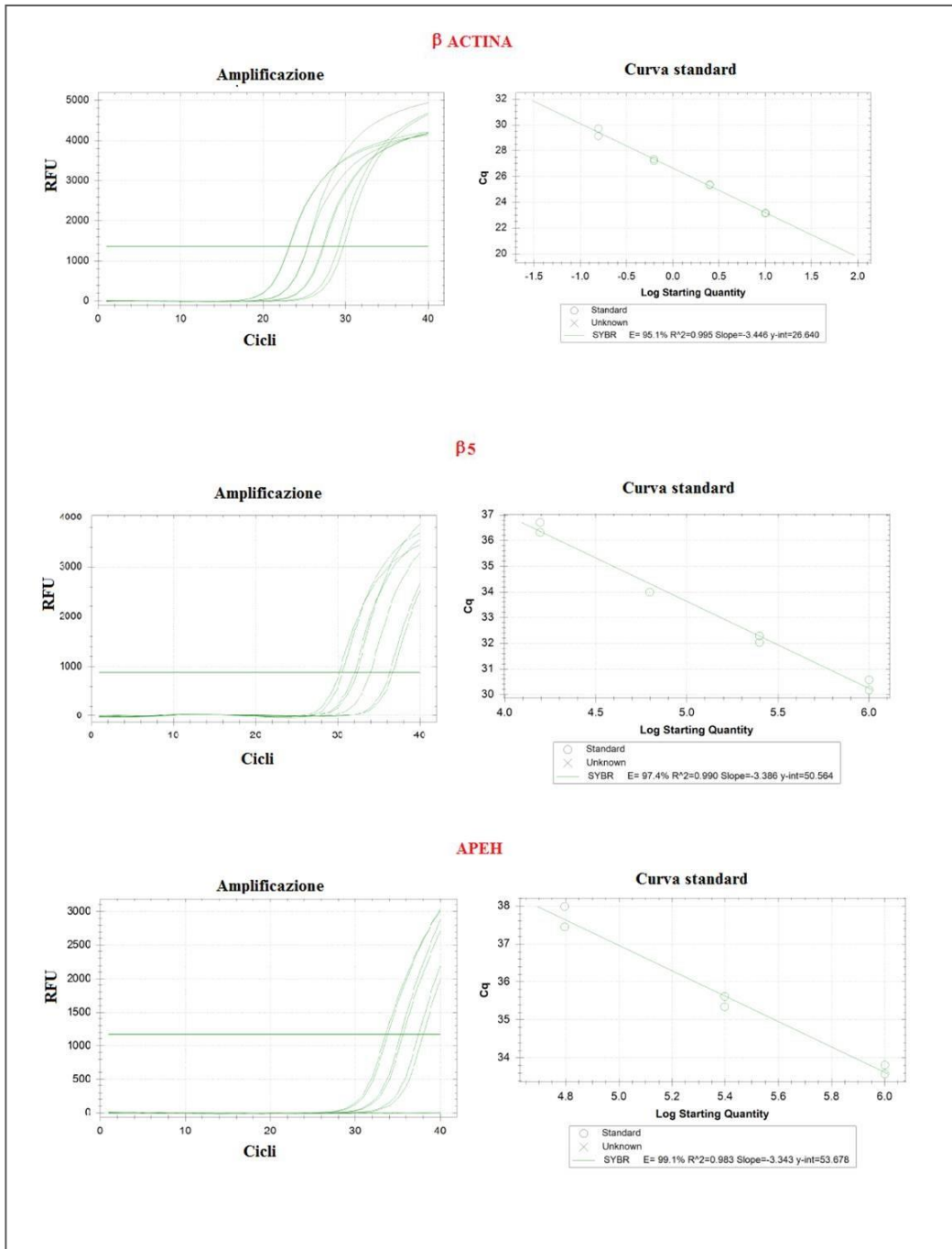


Figura 4.3. Curve di amplificazione e rispettive curve standard degli oligonucleotidi utili alle analisi di espressione dei geni β ACTINA, $\beta 5$ e APEH. Le curve standard sono state ottenute mediante software BIORAD Maestro, per il calcolo del valore di efficienza da utilizzare nella formula di Pfaffl.

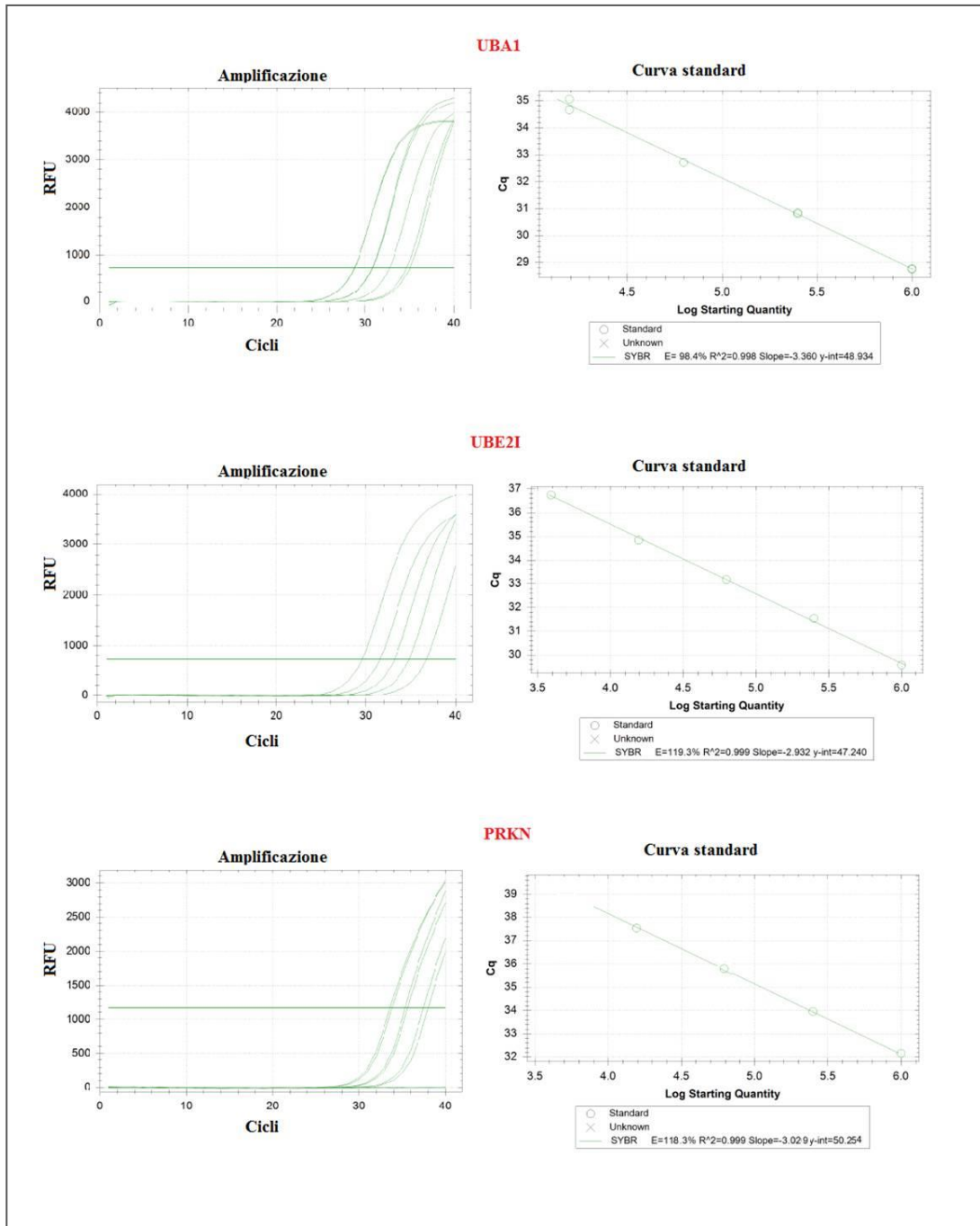


Figura 4.4. Curve di amplificazione e rispettive curve standard degli oligonucleotidi utili alle analisi di espressione dei geni UBA1, UBE2I e PRKN. Le curve standard sono state ottenute mediante software BIORAD Maestro, per il calcolo del valore di efficienza da utilizzare nella formula di Pfaffl.

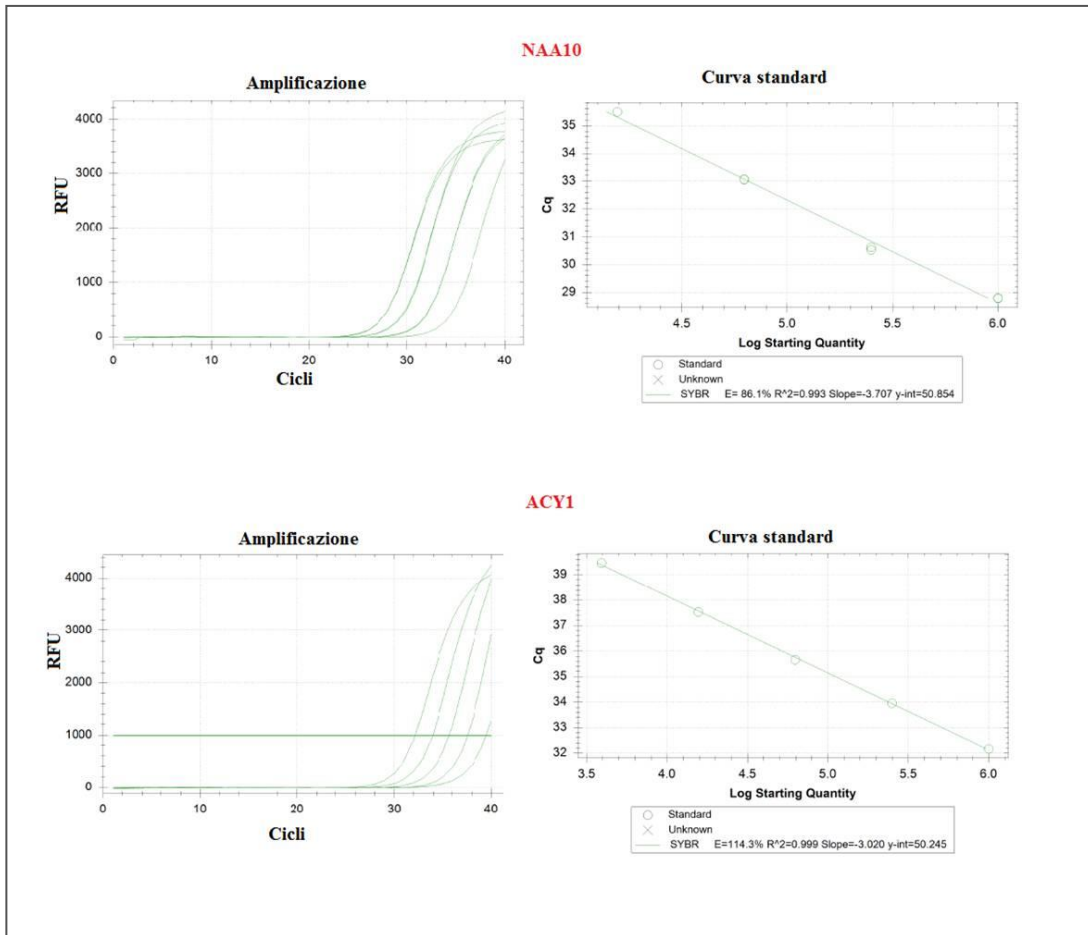


Figura 4.5. Curve di amplificazione e rispettive curve standard degli oligonucleotidi utili alle analisi di espressione dei geni NAA10 e ACY1. Le curve standard sono state ottenute mediante software BIORAD Maestro, per il calcolo del valore di efficienza da utilizzare nella formula di Pfaffl.

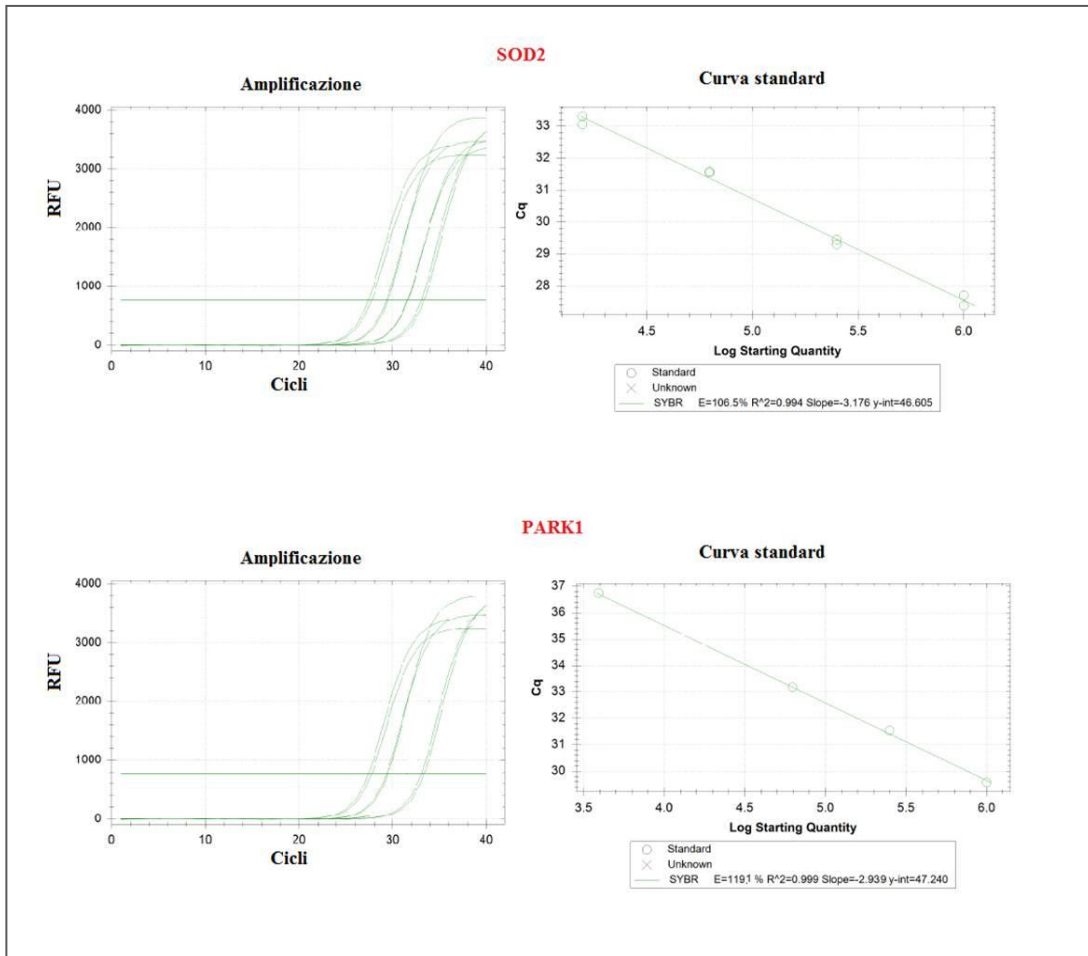


Figura 4.6. Curve di amplificazione e rispettive curve standard degli oligonucleotidi utili alle analisi di espressione dei geni SOD2 e PARK1. Le curve standard sono state ottenute mediante software BIORAD Maestro, per il calcolo del valore di efficienza da utilizzare nella formula di Pfaffl.

Tabella 3. Sequenze degli oligonucleotidi (primers) e rispettive efficienze.

| Primers | Sequenze | Efficienza |
|---|--|-------------------|
| β -actina left β -actina right | 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3' | 95.1% |
| β 5 left β 5 right | 5'-CATGGGCACCATGATCTGT-3' 5'-GAAATCCGGTTCOCTTCACT-3' | 97.4% |
| APEH left APEH right | 5'-CCCCATT CAT CCTTT GT CAC-3' 5'-AAAGCCCAT CTT GCAAAGC-3' | 99.1% |
| UBA1 left UBA1 right | 5'-CAGACATGGA CACCAT TGAGA-3' 5'-GCAGCCGTGT CAGACTTT AAC-3' | 98.4% |
| UBE2I left UBE2I right | 5'-AGGGAAGTCCCGAGACAAAAG-3' 5'-TCCCCGACATGTTCAAAGTC-3' | 119.3% |
| PRKN left PRKN right | 5'-GGAGCTGAGGAATGACTGGA-3' 5'-ACAATGTGAACAATGCTCTGCT-3' | 118.3% |
| NAA10 left NAA10 right | 5'-AGCGGGACCTCACTCAGAT-3' 5'-CTCCACCTTGTTCTCGATGG-3' | 86.1% |
| ACY1 left ACY1 right | 5'-CAGCGACAGGAGAGTGAGC-3' 5'-GAAGAGCGTCACCGATGG-3' | 114.3% |
| PARK1 left PARK1 right | 5'-GTGGCTGCTGCTGAGAAAA-3' 5'-ACTCCCTCCTTGGTTTGGGA-3' | 119.1% |
| SOD2 left SOD2 right | 5'-AATCAGGATCCACTGCAAGG-3' 5'-TAAGCGTGCTCCCACACAT-3' | 106.5% |

In **tabella 3** sono riportate tutte le coppie di *primers* con le rispettive efficienze utilizzate nel calcolo dei livelli di espressione di ogni singolo gene.

In **figura 4.7** sono riportati i grafici ottenuti dalle analisi di espressione del gene che codifica per la sub unità β 5 del proteasoma, del gene che codifica per l'APEH e di altri geni correlati all'attività di questi enzimi, che intervengono in processi che avvengono a monte e a valle di essi.

Nel pannello A si possono osservare i livelli di espressione dei geni che partecipano al pathway dell'APEH; nel pannello B si osservano le analisi per i geni che partecipano al pathway del proteasoma; nel pannello C si osservano le espressioni dei geni SOD2 e PARK1, coinvolti nella risposta antiossidativa il primo e nella trasmissione sinaptica il secondo.

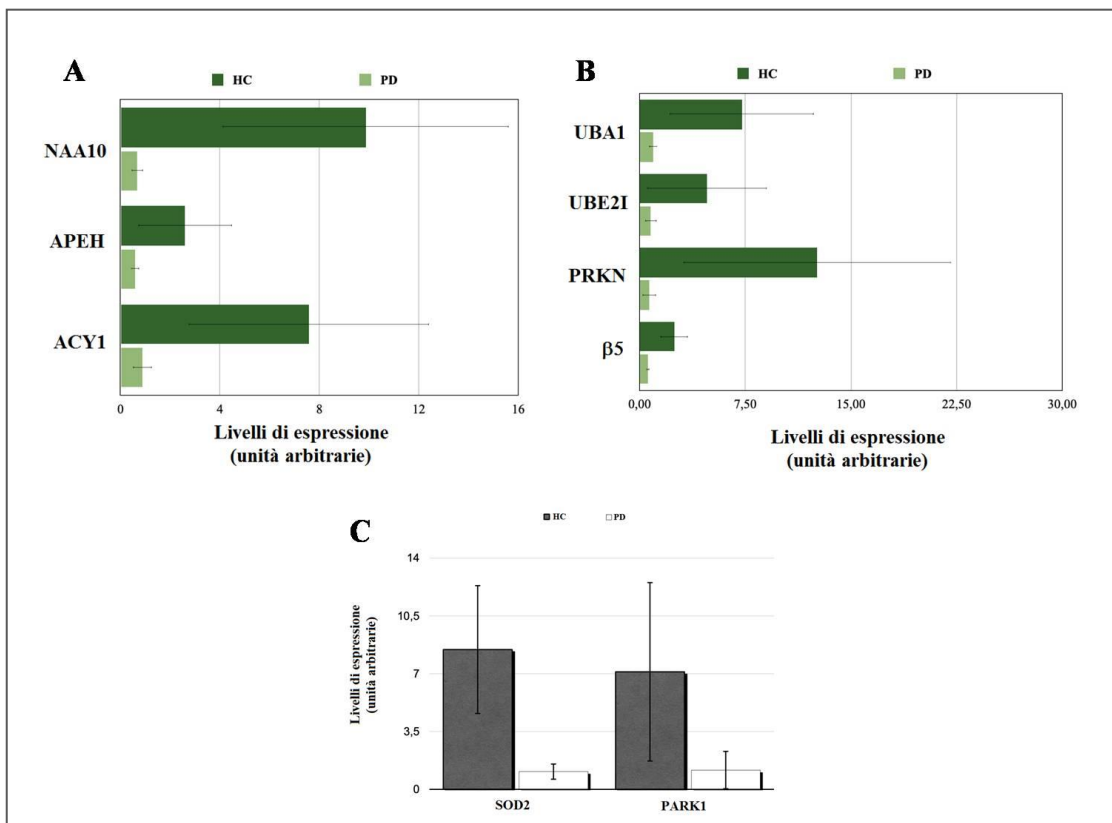


Figura 4.7. Livelli di espressione genica in controlli sani (HC, in colore scuro) e in soggetti malati di Parkinson (PD, in colore chiaro). Pannello A, livelli di espressione dei geni NAA10, APEH e ACY. Pannello B, livelli di espressione dei geni UBA1, UBE2I, PRKN e $\beta 5$. Pannello C, livelli di espressione dei geni SOD2 e PARK1.

Come è possibile osservare dai grafici in figura, vi è una chiara evidenza che per tutti i geni analizzati vi è una notevole *downregulation* nei soggetti malati rispetto ai controlli sani.

Per quanto riguarda i geni correlati al *pathway* del proteasoma (Pannello B), alcuni studi [94, 95] già li descrivono *down-regolati* nei soggetti malati rispetto ai controlli sani; invece, per quanto riguarda l'APEH ed i geni ad essa correlati, è noto solo uno studio proteomico su plasma che vede implicata una riduzione della presenza di ACY1 in PD rispetto a controlli sani [96].

E'interessante l'andamento dell'espressione del gene della SOD2, anch'esso *down-regolato* nei soggetti malati rispetto ai controlli sani. Ci sono poche prove che suggeriscono che la funzione di SOD2 sia direttamente coinvolta nella progressione clinica della malattia di Parkinson. Alcuni studi, effettuati purtroppo su un numero troppo piccolo di pazienti, hanno evidenziato che i livelli di SOD2 sono aumentati nella corteccia frontale dei pazienti di Parkinson [97, 98].

Allo stesso modo, sia i livelli di mRNA che l'attività della SOD2 nel plasma dei pazienti di Parkinson sono risultati essere elevati rispetto ai controlli di pari età anche quando sono nella fase asintomatica della malattia [99-101]. Altri studi hanno contraddetto questi risultati, sostenendo l'idea che non c'è alcun cambiamento nell'attività della SOD2 nel PD [102]. Questo fa pensare che, ad oggi, la variazione di SOD2 nel PD rimane ancora un fenomeno da approfondire, soprattutto in liquidi biologici come il sangue; pertanto, i nostri risultati, che mostrano una chiara riduzione dell'espressione del gene SOD2 nel sangue di pazienti PD, seppur effettuati su una piccola popolazione, sono molto interessanti e possono essere approfonditi mediante un'estensione ad una popolazione più ampia e selezionata a diversi stadi nella patologia.

Per quanto riguarda il gene che codifica per l' α -sinucleina (gene PARK1), anch'esso è risultato *down-regolato* nel sangue dei soggetti malati rispetto ai controlli sani. Alcuni studi hanno evidenziato che tale gene è molto espresso nel plasma di pazienti PD rispetto a controlli sani [103]. Ad oggi, la funzione di tale proteina non è completamente nota, ma sembra essere coinvolta nella regolazione dell'integrità della membrana delle vescicole sinaptiche e nei processi di traffico e di fusione durante la trasmissione del segnale a livello sinaptico. I meccanismi molecolari che collegano l' α -sinucleina alla patogenesi del Parkinson tuttavia non sono ancora noti; l'ipotesi originaria, sulla quale si sono concentrati la maggior parte degli studi, sostiene che la presenza di α -sinucleina mutata o la sua sovra-espressione favorisca la formazione di aggregati proteici, la cui presenza all'interno della cellula, a lungo andare, potrebbe portare ad un effetto tossico e quindi a conseguente morte cellulare [104]. C'è da dire, però, che questa proteina è soggetta a modifiche post traduzionali (come la fosforilazione) che ne alterano la struttura e fanno sì che essa può essere o meno substrato di vari complessi di degradazione cellulari [105]. È stato visto che nella *substantia nigra* il fallimento dell'attività del complesso UPS altera la degradazione dell' α -sinucleina e facilita la formazione di inclusioni citoplasmatiche [88]. Inoltre, aggregati di α -sinucleina modificati con dopamina stimolano meccanismi di autofagia mediata da chaperonine [106, 107], che inducono un accumulo intracellulare anomalo di α -sinucleina nel PD [108].

Quello che è noto è che mutazioni nell' α -sinucleina sono associate alla malattia di Parkinson. Benché la maggior parte dei pazienti presenti un PD idiopatico non-ereditario, in una minoranza (il 5% dei casi) sono state trovate delle mutazioni associabili

all'eziopatogenesi della malattia e quindi ad un PD a carattere ereditario e familiare, dovuto a difetti genetici e quindi a mutazioni in alcuni geni. Tra i geni mutati troviamo in particolare quelli che codificano per: α -sinucleina, la parkina (una E3-ubiquitin ligasi codificata dal gene PRKN) ed altri geni come la dardarina (*LRRK2*), la kinasi-1 putativa indotta da PTEN (*PINK1*) E DJ-1 (*PARK7*) [109].

La presenza nei corpi di Lewy di α -sinucleina con l'ubiquitina e le subunità proteasomali nella malattia del PD sporadico suggerisce che le alterazioni del catabolismo dell' α -sinucleina possono contribuire alla patogenesi del PD. Quindi, le evidenze scientifiche che tale proteina è in qualche modo sottoposta alla degradazione da parte del proteasoma sono molte [110, 111] e, ad oggi, quasi nulla si conosce sul ruolo di questa proteina nel sangue.

Alla luce di tutto questo, i nostri risultati, che indicano livelli di espressione dell' α -sinucleina *down*-regolati nel sangue di pazienti PD, sono molto interessanti, soprattutto se paragonati alle attività del proteasoma negli stessi pazienti PD, che risultano elevate rispetto ai controlli sani (come mostrato in **figura 4.1**). Tutto questo porterebbe a pensare che, visto il legame esistente e confermato tra sistema UPS ed α -sinucleina, molto probabilmente i livelli di questa proteina nel sangue risulterebbero bassi, considerata l'elevata attività proteosomale nella popolazione oggetto dello studio. Sarebbe, pertanto, molto importante capire anche quali sono i livelli di proteina nel sangue, effettuando analisi di *western blot*, e comunque valutare tali livelli anche nelle altre componenti del sangue, come plasma [103] e siero.

4.3 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate con *un* calcolatore online (<https://www.socscistatistics.com>). Come si osserva nelle tabelle in **figura 4.8**, per quanto riguarda le analisi statistiche dei saggi enzimatici è stato effettuato il t-test, che ci ha permesso di riscontrare una significatività dei dati, con un $p = 0.025136$ per le attività saggate nella frazione dei linfociti. Valori significativi sono stati riscontrati anche nelle attività misurate in eritrociti e sangue intero, dove il t-test ha permesso di ottenere rispettivamente valori di $p = 0.026991$ e $p = 0.017628$.

Il test ANOVA ha permesso di ottenere un valore significativo solo per le attività del proteasoma misurate su sangue intero, con un $p = 0.035256$.

| t-test | | | | | | |
|-------------------|---------|-------------|-----------|----------|------------|---------------|
| | | Granulociti | Linfociti | Monociti | Eritrociti | Sangue intero |
| Proteasoma | T-value | -0.83878 | -2.06125 | -1.27493 | 2.02634 | 2.2314 |
| | P-value | 0.204935 | 0.025136 | 0.10727 | 0.026991 | 0.017628 |
| APEH | T-value | 1.08913 | 1.53562 | 0.13693 | 0.57866 | -0.42283 |
| | P-value | 0.143457 | 0.068856 | 0.446114 | 0.284106 | 0.338093 |

| Anova One way | | | | | | |
|----------------------|---------|-------------|-----------|----------|------------|---------------|
| | | Granulociti | Linfociti | Monociti | Eritrociti | Sangue intero |
| Proteasoma | F-ratio | 0.70355 | 4.24875 | 1.62544 | 4.10604 | 4.97913 |
| | P-value | 0.409871 | 0.050272 | 0.21454 | 0.053982 | 0.035256 |
| APEH | F-ratio | 1.1862 | 2.235812 | 0.01875 | 0.33484 | 0.17878 |
| | P-value | 0.28691 | 0.137712 | 0.892229 | 0.568213 | 0.676185 |

Figura 4.8. Risultati ottenuti tramite un calcolatore online (<https://www.socscistatistics.com>) di analisi statistica. I test statistici eseguiti sono stati due: t-test (in alto) e test Anova (in basso). In queste tabelle sono riportate le analisi statistiche eseguite per le analisi enzimatiche del proteasoma (attività chimotriptica) e dell'APEH (attività esopeptidasica), per estratti proteici da frazioni cellulari del sangue (granulociti, linfociti, monociti ed eritrociti) e sangue intero.

5

CONCLUSIONI

5.1 Conclusioni e prospettive future

La necessità di disporre di biomarcatori per effettuare analisi in vivo, affidabili, gestibili e quindi di facile impiego, che aiutino la diagnosi di malattie neurodegenerative come Parkinson e Alzheimer, sta crescendo soprattutto negli ultimi anni [73– 76], considerata anche l'elevata incidenza di queste patologie a livello mondiale e quindi la necessità di avere una diagnosi quanto più precoce possibile per intervenire tempestivamente sul decorso della malattia.

Gli studi che attualmente sono stati fatti e sono in corso, hanno lo scopo soprattutto di andare a trovare alterazioni biologiche correlate al PD e/o AD, che possono essere rilevate anche fuori dal sistema nervoso centrale, ad esempio, nelle cellule del sangue periferico (come linfociti ed eritrociti), nel plasma ed in altre componenti del sangue [76, 92-94, 96].

In linea con questi studi, tale progetto ha avuto come obiettivo l'identificazione di potenziali biomarcatori da sangue e/o sue componenti rivolgendo una particolare attenzione al sistema ubiquitina-proteasoma ed al *pathway* dell'APEH. Facendo riferimento ad un lavoro che si inserisce in un progetto più ampio, lo studio ha avuto come scopo quello di contribuire alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base di patologie neurodegenerative, in particolare quelle facente parte del gruppo delle proteinopatie.

Questo studio ha permesso di valutare, in pazienti PD e controlli sani, le attività di questi due complessi sia nel sangue intero che in sue frazioni cellulari (granulociti, linfociti,

monociti ed eritrociti) ed il livello di espressione di molti geni coinvolti nei *pathways* molecolari di entrambi gli enzimi.

I risultati ottenuti, in parte contrastanti con quello che è stato già riportato in pochissimi studi di letteratura, sono interessanti non solo per l'aggiunta di tasselli ad alcuni aspetti molecolari delle patologie neurodegenerative (in questo caso particolare, della malattia del Parkinson) ma anche preziosi, considerata l'originalità dello studio e la scarsa letteratura a riguardo. Infatti, soprattutto per l'APEH e gli enzimi coinvolti nella sua via metabolica non esistono ad oggi altri studi effettuati su componenti del sangue; l'APEH resta ancora un enzima poco studiato e con ancora tanti aspetti da comprendere, come ad esempio il suo vero coinvolgimento nello stress ossidativo e, più in generale, in patologie come quelle neurodegenerative [76]. Inoltre, questo enzima possiede anche un'attività endoproteasica [57– 59] e risulta essere molto interessante per gli studi di stress ossidativo, essendo questa attività diretta verso substrati ossidati e/o comunque danneggiati da stress ossidativo, che l'APEH svolge in cooperazione con il proteasoma [112 -115].

I risultati raggiunti dal presente studio rappresentano una interessante integrazione di quelli ottenuti da quello pilota precedentemente descritto [76], ed entrambi sarebbero da estendere ad una popolazione più ampia e a fasi intermedie delle due patologie AD e PD. Mentre lo studio pilota ha dimostrato che i livelli dell'attività eso- ed endo- peptidasica dell'APEH e quelli dell'attività chimotriptica del proteasoma decrescono significativamente nei pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer; questo studio ha mostrato il contrario per l'attività del proteasoma, ovvero un aumento dell'attività

chimotriptica di questo complesso negli eritrociti di pazienti affetti dalla malattia di Parkinson, che riflette poi anche la situazione del sangue intero, essendo questa componente cellulare la maggioritaria nel sangue. Quindi, queste due patologie neurodegenerative sembrano mostrare un'alterazione diversa della funzionalità dei due complessi enzimatici, suggerendo che disfunzioni differenti dei sistemi di proteolisi cellulare possano avere un ruolo nell'insorgenza di una o dell'altra patologia. La cosa più interessante, che andrebbe studiata anche per la popolazione AD, sono le attività enzimatiche analizzate nelle varie componenti cellulari facente parte dei globuli bianchi; in particolare, nei linfociti è stata vista una significativa riduzione delle attività nei malati rispetto ai sani, come si osserva, seppur meno evidente e senza significatività statistica, anche nei granulociti e nei monociti. Come già descritto, il dato è interessante nei linfociti, se paragonato all'attività dell'APEH negli stessi, che risulta essere più alta nei malati rispetto ai sani, questo fenomeno fa pensare che l'APEH è come se andasse a compensare il deficit proteosomale in quei soggetti malati di PD, risultando pertanto più attiva. Interessante sarebbe capire nella patologia AD, i due biomarcatori come si comportano nelle varie componenti bianche analizzate in questo studio, per meglio comprendere le basi molecolari in cui i due *biomarker* sono coinvolti nelle due patologie. Inoltre, per quanto riguarda la patologia del Parkinson, alla luce di quanto descritto in letteratura e dai nostri risultati, si potrebbe pensare che l'accumulo di α -sinucleina, una caratteristica neuropatologica del PD, potrebbe essere collegato alla compromissione del sistema proteasomale, piuttosto che dell'APEH [104].

Se tali risultati saranno confermati in successivi e più ampi studi prospettici, la misurazione dell'attività di tali sistemi enzimatici, effettuata su un prelievo di sangue, potrebbe consentire una diagnosi precoce dell'AD e/o del PD e di individuare i soggetti a rischio di demenza. Inoltre, ulteriori evidenze di una destabilizzazione dell'attività del proteasoma e dell'APEH, nonché l'individuazione di un possibile collegamento tra loro, potrebbero porre le basi per la ricerca di mirate strategie terapeutiche.

Ulteriori studi saranno necessari per approfondire il ruolo di questi due complessi nella patologie neurodegenerative, estendendoli ad altre componenti del sangue (come plasma, siero, piastrine etc...) e ad una popolazione più ampia, utilizzando tecniche sofisticate che mirino alla comprensione dei processi di stress ossidativo, come l'analisi in vitro dell'attività endoproteasica dell'APEH, mediante l'utilizzo di peptidi disegnati *ad hoc*, oppure studi di interazione proteina-proteina, per comprendere tutti i fattori coinvolti in questi processi catabolici difettivi nella neurodegenerazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Narayan, P., Ehsani, S., & Lindquist, S. (2014). Combating neurodegenerative disease with chemical probes and model systems. *Nature chemical biology*, *10*(11), 911–920. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1663>
2. Soto, C., & Pritzkow, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, *21*(10), 1332–1340. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0235-9>
3. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)*, *388*(10053), 1545–1602. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31678-6)
4. Boller, F., & Forbes, M. M. (1998). History of dementia and dementia in history: an overview. *Journal of the neurological sciences*, *158*(2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(98\)00128-2](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(98)00128-2)
5. Jack, C. R., Jr, Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., Sperling, R., ... Contributors (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, *14*(4), 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
6. Takahashi, R. H., Nagao, T., & Gouras, G. K. (2017). Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathology international*, *67*(4), 185–193. <https://doi.org/10.1111/pin.12520>
7. Tolnay, M., & Probst, A. (1999). REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuropathology and applied neurobiology*, *25*(3), 171–187. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.1999.00182.x>
8. Liu, Q., Kuo, Y. P., Shen, J., Lukas, R. J., & Wu, J. (2015). Roles of nicotinic acetylcholine receptor β subunit cytoplasmic loops in acute desensitization and single-channel features. *Neuroscience*, *289*, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.016>
9. Bonda, D. J., Wang, X., Lee, H. G., Smith, M. A., Perry, G., & Zhu, X. (2014). Neuronal failure in Alzheimer's disease: a view through the oxidative stress looking-glass. *Neuroscience bulletin*, *30*(2), 243–252. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1424-x>

10. Jankovic J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 79(4), 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
11. Lees A. J. (2007). Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 22 Suppl 17, S327–S334. <https://doi.org/10.1002/mds.21684>
12. Borek, L. L., Amick, M. M., & Friedman, J. H. (2006). Non-motor aspects of Parkinson's disease. *CNS spectrums*, 11(7), 541–554. <https://doi.org/10.1017/s1092852900013560>
13. Pagano, G., Niccolini, F., & Politis, M. (2016). Imaging in Parkinson's disease. *Clinical medicine (London, England)*, 16(4), 371–375. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-4-371>
14. Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., & Takahashi, H. (2013). The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology*, 47(2), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8280-y>
15. Lucas, H. R., & Fernández, R. D. (2020). Navigating the dynamic landscape of alpha-synuclein morphology: a review of the physiologically relevant tetrameric conformation. *Neuralregenerationresearch*, 15(3), 407–415. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.265792>
16. Scheperjans, F., Derkinderen, P., & Borghammer, P. (2018). The Gut and Parkinson's Disease: Hype or Hope?. *Journal of Parkinson's disease*, 8(s1), S31–S39. <https://doi.org/10.3233/JPD-181477>
17. Kurtishi, A., Rosen, B., Patil, K. S., Alves, G. W., & Møller, S. G. (2019). Cellular Proteostasis in Neurodegeneration. *Molecular neurobiology*, 56(5), 3676–3689. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1334-z>
18. Dröse, S., & Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Advances in experimental medicine and biology*, 748, 145–169. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_6
19. Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology*, 199(3), 316–331. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018>
20. Sompol, P., Ittarat, W., Tangpong, J., Chen, Y., Doubinskaia, I., Batinic-Haberle, I., Abdul, H. M., Butterfield, D. A., & St Clair, D. K. (2008). A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience*, 153(1), 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.044>

21. Krinsky N. I. (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 200(2), 248–254. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>
22. Nakai, A., Yamauchi, Y., Sumi, S., & Tanaka, K. (2012). Role of acylamino acid-releasing enzyme/oxidized protein hydrolase in sustaining homeostasis of the cytoplasmic antioxidative system. *Planta*, 236(2), 427–436. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1614-1>
23. Shimizu, K., Kiuchi, Y., Ando, K., Hayakawa, M., & Kikugawa, K. (2004). Coordination of oxidized protein hydrolase and the proteasome in the clearance of cytotoxic denatured proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(1), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.231>
24. Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U., & Saso, L. (2017). Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug design, development and therapy*, 11, 797–810. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S130514>
25. Procaccini, C., Santopaolo, M., Faicchia, D., Colamatteo, A., Formisano, L., de Candia, P., Galgani, M., De Rosa, V., & Matarese, G. (2016). Role of metabolism in neurodegenerative disorders. *Metabolism: clinical and experimental*, 65(9), 1376–1390. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.05.018>
26. Jung, T., & Grune, T. (2012). Structure of the proteasome. *Progress in molecular biology and translational science*, 109, 1–39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397863-9.00001-8>
27. Kierszenbaum A. L. (2000). The 26S proteasome: ubiquitin-mediated proteolysis in the tunnel. *Molecular reproduction and development*, 57(2), 109–110. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2<109::AID-MRD1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200010)57:2<109::AID-MRD1>3.0.CO;2-9)
28. Ciechanover, A., Orian, A., & Schwartz, A. L. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(5), 442–451. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200005\)22:5<442::AID-BIES6>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<442::AID-BIES6>3.0.CO;2-Q)
29. Coux, O., Tanaka, K., & Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry*, 65, 801–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.004101>
30. Groll, M., & Huber, R. (2004). Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochimica et biophysica acta*, 1695(1-3), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.025>

31. Nussbaum, A. K., Dick, T. P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanović, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D. H., Huber, R., Rammensee, H. G., & Schild, H. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12504–12509. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12504>
32. Zwickl, P., Voges, D., & Baumeister, W. (1999). The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354(1389), 1501–1511. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0494>
33. Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., & Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nature structural biology*, 7(11), 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/80992>
34. Kriegenburg, F., Poulsen, E. G., Koch, A., Krüger, E., & Hartmann-Petersen, R. (2011). Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling*, 15(8), 2265–2299. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3590>
35. Kudo, M., Sugasawa, K., Hori, T., Enomoto, T., Hanaoka, F., & Ui, M. (1991). Human ubiquitin-activating enzyme (E1): compensation for heat-labile mouse E1 and its gene localization on the X chromosome. *Experimental cell research*, 192(1), 110–117. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90164-p](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90164-p)
36. Watanabe, T. K., Fujiwara, T., Kawai, A., Shimizu, F., Takami, S., Hirano, H., Okuno, S., Ozaki, K., Takeda, S., Shimada, Y., Nagata, M., Takaichi, A., Takahashi, E., Nakamura, Y., & Shin, S. (1996). Cloning, expression, and mapping of UBE2I, a novel gene encoding a human homologue of yeast ubiquitin-conjugating enzymes which are critical for regulating the cell cycle. *Cytogenetics and cell genetics*, 72(1), 86–89. <https://doi.org/10.1159/000134169>
37. Seirafi, M., Kozlov, G., & Gehring, K. (2015). Parkin structure and function. *The FEBS journal*, 282(11), 2076–2088. <https://doi.org/10.1111/febs.13249>
38. Fiesel, F. C., Caulfield, T. R., Moussaud-Lamodière, E. L., Ogaki, K., Dourado, D. F., Flores, S. C., Ross, O. A., & Springer, W. (2015). Structural and Functional Impact of Parkinson Disease-Associated Mutations in the E3 Ubiquitin Ligase Parkin. *Human mutation*, 36(8), 774–786. <https://doi.org/10.1002/humu.22808>
39. Mata, I. F., Lockhart, P. J., & Farrer, M. J. (2004). Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Human molecular genetics*, 13 Spec No 1, R127–R133. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh089>

40. Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences*, *31*(1), 137–155. <https://doi.org/10.1007/BF02705243>
41. Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., & Schrag, J. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein engineering*, *5*(3), 197–211. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.197>
42. Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K., & Doctor, B. P. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *2*(3), 366–382. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020309>
43. Nardini, M., & Dijkstra, B. W. (1999). Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*, *9*(6), 732–737. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)00037-8)
44. Bartlam, M., Wang, G., Yang, H., Gao, R., Zhao, X., Xie, G., Cao, S., Feng, Y., & Rao, Z. (2004). Crystal structure of an acylpeptide hydrolase/esterase from *Aeropyrum pernix* K1. *Structure (London, England : 1993)*, *12*(8), 1481–1488. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.05.019>
45. Perrier, J., Durand, A., Giardina, T., & Puigserver, A. (2005). Catabolism of intracellular N-terminal acetylated proteins: involvement of acylpeptide hydrolase and acylase. *Biochimie*, *87*(8), 673–685. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.002>
46. Shimizu, K., Kiuchi, Y., Ando, K., Hayakawa, M., & Kikugawa, K. (2004). Coordination of oxidized protein hydrolase and the proteasome in the clearance of cytotoxic denatured proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, *324*(1), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.231>
47. Scaloni, A., Jones, W., Pospischil, M., Sassa, S., Schneewind, O., Popowicz, A. M., Bossa, F., Graziano, S. L., & Manning, J. M. (1992). Deficiency of acylpeptide hydrolase in small-cell lung carcinoma cell lines. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, *120*(4), 546–552.
48. Yamin, R., Bagchi, S., Hildebrant, R., Scaloni, A., Widom, R. L., & Abraham, C. R. (2007). Acyl peptide hydrolase, a serine proteinase isolated from conditioned medium of neuroblastoma cells, degrades the amyloid-beta peptide. *Journal of neurochemistry*, *100*(2), 458–467. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04251.x>
49. Cleynen, I., Jüni, P., Bekkering, G. E., Nüesch, E., Mendes, C. T., Schmied, S., Wyder, S., Kellen, E., Villiger, P. M., Rutgeerts, P., Vermeire, S., & Lottaz, D. (2011). Genetic evidence supporting the association of protease and protease inhibitor genes with

- inflammatory bowel disease: a systematic review. *PloSone*, 6(9), e24106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024106>
50. Nguyen, K. T., & Pei, D. (2005). Purification and characterization of enzymes involved in the degradation of chemotactic N-formyl peptides. *Biochemistry*, 44(23), 8514–8522. <https://doi.org/10.1021/bi050191o>
51. Chadwick, V. S., Mellor, D. M., Myers, D. B., Selden, A. C., Keshavarzian, A., Broom, M. F., & Hobson, C. H. (1988). Production of peptides inducing chemotaxis and lysosomal enzyme release in human neutrophils by intestinal bacteria in vitro and in vivo. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 23(1), 121–128. <https://doi.org/10.3109/00365528809093861>
52. Hobson, C. H., Roberts, E. C., Broom, M. F., Mellor, D. M., Sherriff, R. M., & Chadwick, V. S. (1990). Radio-immunoassay for formyl methionylleucyl phenylalanine. I. Development and application to assessment of chemotactic peptide production by enteric bacteria. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 5(1), 32–37. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1990.tb01765.x>
53. Fujino, T., Watanabe, K., Beppu, M., Kikugawa, K., & Yasuda, H. (2000). Identification of oxidized protein hydrolase of human erythrocytes as acylpeptide hydrolase. *Biochimicaetbiophysicaacta*, 1478(1), 102–112. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00004-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00004-2)
54. Merker, K., & Grune, T. (2000). Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. *Experimentalgerontology*, 35(6-7), 779–786. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00140-6](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00140-6)
55. Nakai, A., Yamauchi, Y., Sumi, S., & Tanaka, K. (2012). Role of acylamino acid-releasing enzyme/oxidized protein hydrolase in sustaining homeostasis of the cytoplasmic antioxidative system. *Planta*, 236(2), 427–436. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1614-1>
56. Fujino, T., Tada, T., Beppu, M., & Kikugawa, K. (1998). Purification and characterization of a serine protease in erythrocyte cytosol that is adherent to oxidized membranes and preferentially degrades proteins modified by oxidation and glycation. *Journal of biochemistry*, 124(6), 1077–1085. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022224>
57. Fujino, T., Kojima, M., Beppu, M., Kikugawa, K., Yasuda, H., & Takahashi, K. (2000). Identification of the cleavage sites of oxidized protein that are susceptible to oxidized protein hydrolase (OPH) in the primary and tertiary structures of the protein. *Journal of biochemistry*, 127(6), 1087–1093. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022702>

58. Shimizu, K., Ikegami-Kawai, M., & Takahashi, T. (2009). Increased oxidized protein hydrolase activity in serum and urine of diabetic rat models. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 32(9), 1632–1635. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1632>
59. Bulteau, A. L., Verbeke, P., Petropoulos, I., Chaffotte, A. F., & Friguet, B. (2001). Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 276(49), 45662–45668. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105374200>
60. Portero-Otín, M., Pamplona, R., Ruiz, M. C., Cabisco, E., Prat, J., & Bellmunt, M. J. (1999). Diabetes induces an impairment in the proteolytic activity against oxidized proteins and a heterogeneous effect in nonenzymatic protein modifications in the cytosol of rat liver and kidney. *Diabetes*, 48(11), 2215–2220. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.11.2215>
61. López-Granero, C., Cardona, D., Giménez, E., Lozano, R., Barril, J., Aschner, M., Sánchez-Santed, F., & Cañadas, F. (2014). Comparative study on short- and long-term behavioral consequences of organophosphate exposure: relationship to AChE mRNA expression. *Neurotoxicology*, 40, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.11.004>
62. Sandoval, R., Navarro, S., García-Rojo, G., Calderón, R., Pedrero, A., Sandoval, S., Wyneken, U., & Pancetti, F. (2012). Synaptic localization of acylpeptide hydrolase in adult rat telencephalon. *Neuroscience letters*, 520(1), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.041>
63. Yamin, R., Zhao, C., O'Connor, P. B., McKee, A. C., & Abraham, C. R. (2009). Acyl peptide hydrolase degrades monomeric and oligomeric amyloid-beta peptide. *Molecular neurodegeneration*, 4, 33. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-33>
64. Fabre, B., Lambour, T., Garrigues, L., Amalric, F., Vigneron, N., Menneteau, T., Stella, A., Monsarrat, B., Van den Eynde, B., Burlet-Schiltz, O., & Bousquet-Dubouch, M. P. (2015). Deciphering preferential interactions within supramolecular protein complexes: the proteasome case. *Molecular systems biology*, 11(1), 771. <https://doi.org/10.15252/msb.20145497>
65. Hollebeke, J., Van Damme, P., & Gevaert, K. (2012). N-terminal acetylation and other functions of N α -acetyltransferases. *Biological chemistry*, 393(4), 291–298. <https://doi.org/10.1515/hsz-2011-0228>
66. Dörfel, M. J., & Lyon, G. J. (2015). The biological functions of Naa10 - From amino-terminal acetylation to human disease. *Gene*, 567(2), 103–131. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.085>

67. Liu, C. C., Zhu, H. Y., Dong, X. M., Ning, D. L., Wang, H. X., Li, W. H., Yang, C. P., & Wang, B. C. (2013). Identification and analysis of the acetylated status of poplar proteins reveals analogous N-terminal protein processing mechanisms with other eukaryotes. *PLoS One*, 8(3), e58681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058681>
68. Liszczak, G., Goldberg, J. M., Foyn, H., Petersson, E. J., Arnesen, T., & Marmorstein, R. (2013). Molecular basis for N-terminal acetylation by the heterodimeric NatA complex. *Nature structural & molecular biology*, 20(9), 1098–1105. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2636>
69. Jones, W. M., Scaloni, A., Bossa, F., Popowicz, A. M., Schneewind, O., & Manning, J. M. (1991). Genetic relationship between acylpeptide hydrolase and acylase, two hydrolytic enzymes with similar binding but different catalytic specificities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2194–2198. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2194>
70. Lindner, H. A., Alary, A., Boju, L. I., Sulea, T., & Ménard, R. (2005). Roles of dimerization domain residues in binding and catalysis by aminoacylase-1. *Biochemistry*, 44(48), 15645–15651. <https://doi.org/10.1021/bi051180y>
71. Van Coster, R. N., Gerlo, E. A., Giardina, T. G., Engelke, U. F., Smet, J. E., De Praeter, C. M., Meersschaut, V. A., De Meirleir, L. J., Seneca, S. H., Devreese, B., Leroy, J. G., Herga, S., Perrier, J. P., Wevers, R. A., & Lissens, W. (2005). Aminoacylase I deficiency: a novel inborn error of metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(3), 1322–1326. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.126>
72. Mandel, S. A., Morelli, M., Halperin, I., & Korczyn, A. D. (2010). Biomarkers for prediction and targeted prevention of Alzheimer's and Parkinson's diseases: evaluation of drug clinical efficacy. *The EPMA journal*, 1(2), 273–292. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0036-z>
73. Humpel C. (2011). Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends in biotechnology*, 29(1), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.09.007>
74. Growdon J. H. (1999). Biomarkers of Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 56(3), 281–283. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.3.281>
75. Palmieri, G., Cocca, E., Gogliettino, M., Valentino, R., Ruvo, M., Cristofano, G., Angiolillo, A., Balestrieri, M., Rossi, M., & Di Costanzo, A. (2017). Low Erythrocyte Levels of Proteasome and Acyl-Peptide Hydrolase (APEH) Activities in Alzheimer's Disease: A Sign of Defective Proteostasis?. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 60(3), 1097–1106. <https://doi.org/10.3233/JAD-170389>
76. Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers?. *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>

77. <https://www.aifa.gov.it/-/i-biomarcatori-strumento-prezioso-per-lo-sviluppo-di-nuovi-farmaci>
78. WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>
79. WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. 1993. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>
80. Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 30(12), 1591–1601. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
81. Wilson, K., & Walker, J. (Eds.). (2005). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (6th ed.). Cambridge: Cambridge University <https://doi.org/10.1017/CBO9780511813412>
82. Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleicacidsresearch*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
83. Fornai, F., Lenzi, P., Gesi, M., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C. L., Ruffoli, R., Soldani, P., Ruggieri, S., Alessandri, M. G., & Paparelli, A. (2003). Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(26), 8955–8966. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-26-08955.2003>
84. McNaught, K. S., Mytilineou, C., Jnobaptiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jennert, P., & Olanow, C. W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *Journal of neurochemistry*, 81(2), 301–306. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00821.x>
85. McNaught, K. S., Perl, D. P., Brownell, A. L., & Olanow, C. W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 56(1), 149–162. <https://doi.org/10.1002/ana.20186>
86. Lang-Rollin, I., Rideout, H., & Stefanis, L. (2003). Ubiquitinated inclusions and neuronal cell death. *Histology and histopathology*, 18(2), 509–517. <https://doi.org/10.14670/HH-18.509>

87. Lang-Rollin, I., Vekrellis, K., Wang, Q., Rideout, H. J., & Stefanis, L. (2004). Application of proteasomal inhibitors to mouse sympathetic neurons activates the intrinsic apoptotic pathway. *Journal of neurochemistry*, *90*(6), 1511–1520. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02684.x>
88. McNaught, K. S., & Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, *297*(3), 191–194. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01701-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01701-8)
89. McNaught, K. S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., & Olanow, C. W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Experimental neurology*, *179*(1), 38–46. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8050>
90. López Salom, M., Morelli, L., Castaño, E. M., Soto, E. F., & Pasquini, J. M. (2000). Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*, *62*(2), 302–310. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20001015\)62:2<302::AID-JNR15>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20001015)62:2<302::AID-JNR15>3.0.CO;2-L)
91. Keller, J. N., Hanni, K. B., & Markesbery, W. R. (2000). Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, *75*(1), 436–439. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750436.x>
92. Martins-Branco, D., Esteves, A. R., Santos, D., Arduino, D. M., Swerdlow, R. H., Oliveira, C. R., Januario, C., & Cardoso, S. M. (2012). Ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease: a keeper or a witness?. *Experimental neurology*, *238*(2), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.08.008>
93. Bronstein, J. M., & Chou, A. P. (2006). Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Neurology*, *67*(1), 182. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000229918.11244.7a>
94. Ullrich, C., Mlekusch, R., Kuschnig, A., Marksteiner, J., & Humpel, C. (2010). Ubiquitin enzymes, ubiquitin and proteasome activity in blood mononuclear cells of MCI, Alzheimer and Parkinson patients. *Current Alzheimer research*, *7*(6), 549–555. <https://doi.org/10.2174/156720510792231766>
95. Lehtonen, Š., Sonninen, T. M., Wojciechowski, S., Goldsteins, G., & Koistinaho, J. (2019). Dysfunction of Cellular Proteostasis in Parkinson's Disease. *Frontiers in neuroscience*, *13*, 457. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00457>
96. Posavi, M., Diaz-Ortiz, M., Liu, B., Swanson, C. R., Skrinak, R. T., Hernandez-Con, P., Amado, D. A., Fullard, M., Rick, J., Siderowf, A., Weintraub, D., McCluskey, L., Trojanowski, J. Q., Dewey, R. B., Jr, Huang, X., & Chen-Plotkin, A. S. (2019). Characterization of Parkinson's disease using blood-based biomarkers: A multicohort

proteomic analysis. *PLoS medicine*, 16(10), e1002931.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002931>

97. Radunović, A., Porto, W. G., Zeman, S., & Leigh, P. N. (1997). Increased mitochondrial superoxide dismutase activity in Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Neuroscience letters*, 239(2-3), 105–108. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00905-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00905-1)
98. Ferrer, I., Perez, E., Dalfó, E., & Barrachina, M. (2007). Abnormal levels of prohibitin and ATP synthase in the substantia nigra and frontal cortex in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 415(3), 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.01.026>
99. Santiago, J. A., Scherzer, C. R., & Potashkin, J. A. (2014). Network analysis identifies SOD2 mRNA as a potential biomarker for Parkinson's disease. *PloSone*, 9(10), e109042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109042>
100. Ihara, Y., Chuda, M., Kuroda, S., & Hayabara, T. (1999). Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data. *Journal of the neurological sciences*, 170(2), 90–95. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(99\)00192-6](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(99)00192-6)
101. Flynn, J. M., & Melov, S. (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free radical biology & medicine*, 62, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.027>
102. Marttila, R. J., Lorentz, H., & Rinne, U. K. (1988). Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *Journal of the neurological sciences*, 86(2-3), 321–331. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(88\)90108-6](https://doi.org/10.1016/0022-510x(88)90108-6)
103. Ng, A., Tan, Y. J., Lu, Z., Ng, E., Ng, S., Chia, N., Setiawan, F., Xu, Z., Tay, K. Y., Prakash, K. M., Au, W. L., Tan, E. K., & Tan, L. (2019). Plasma alpha-synuclein detected by single molecule array is increased in PD. *Annals of clinical and translational neurology*, 6(3), 615–619. <https://doi.org/10.1002/acn3.729>
104. Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 211–233. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113313>
105. McKinnon, C., De Snoo, M. L., Gondard, E., Neudorfer, C., Chau, H., Ngana, S. G., O'Hara, D. M., Brotchie, J. M., Koprach, J. B., Lozano, A. M., Kalia, L. V., & Kalia, S. K. (2020). Early-onset impairment of the ubiquitin-proteasome system in dopaminergic neurons caused by α -synuclein. *Acta neuropathologica communications*, 8(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-0894-0>

106. Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5688), 1292–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>
107. Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., & Stefanis, L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry*, *283*(35), 23542–23556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801992200>
108. Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D. C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P. T., Sulzer, D., & Cuervo, A. M. (2008). Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of clinical investigation*, *118*(2), 777–788. <https://doi.org/10.1172/JCI32806>
109. Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(1), a008888. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008888>
110. Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N., & Rubinsztein, D. C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry*, *278*(27), 25009–25013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300227200>
111. Bennett, M. C., Bishop, J. F., Leng, Y., Chock, P. B., Chase, T. N., & Mouradian, M. M. (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *The Journal of biological chemistry*, *274*(48), 33855–33858. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33855>
112. Palmieri, G., Bergamo, P., Luini, A., Ruvo, M., Gogliettino, M., Langella, E., Saviano, M., Hegde, R. N., Sandomenico, A., & Rossi, M. (2011). Acylpeptide hydrolase inhibition as targeted strategy to induce proteasomal down-regulation. *PloSone*, *6*(10), e25888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025888>
113. Bergamo, P., Cocca, E., Palumbo, R., Gogliettino, M., Rossi, M., & Palmieri, G. (2013). RedOx status, proteasome and APEH: insights into anticancer mechanisms of t10,c12-conjugated linoleic acid isomer on A375 melanoma cells. *PloSone*, *8*(11), e80900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080900>
114. Gogliettino, M., Riccio, A., Balestrieri, M., Cocca, E., Facchiano, A., D'Arco, T. M., Tesoro, C., Rossi, M., & Palmieri, G. (2014). A novel class of bifunctional acylpeptide hydrolases--potential role in the antioxidant defense systems of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *The FEBS journal*, *281*(1), 401–415. <https://doi.org/10.1111/febs.12610>

115. Riccio, A., Gogliettino, M., Palmieri, G., Balestrieri, M., Facchiano, A., Rossi, M., Palumbo, S., Monti, G., & Cocca, E. (2015). A New APEH Cluster with Antioxidant Functions in the Antarctic Hemoglobinless Icefish *Chionodraco hamatus*. *PloSone*, *10*(5), e0125594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125594>