

1.INTRODUZIONE	3
1.1 La degradazione delle proteine	4
1.2 L'ubiquitina come segnale per la degradazione.....	5
1.3 La struttura del proteasoma 26S	8
1.4 L'immunoproteasoma	11
1.5 Il complesso regolatore PA28	13
1.6 I geni LMP ed i loro polimorfismi	15
1.7 Il proteasoma nel sistema nervoso centrale	16
1.8 L' invecchiamento	17
1.9 Il sistema ubiquitina-proteasoma nell'invecchiamento	19
1.10 Il sistema ubiquitina-proteasoma nell'invecchiamento cerebrale.....	22
1.11 I primati non umani come modello per l'invecchiamento	24
2. SCOPO DELLA TESI.....	26
3. MATERIALI E METODI.....	29
4. RISULTATI.....	38
4.1 L'immunoproteasoma è espresso nel sistema nervoso centrale di soggetti anziani non colpiti da demenza e in pazienti affetti da AD.	39
4.2 L'espressione cerebrale dei proteasomi e dell'immunoproteasoma è influenzata dall'invecchiamento.	40
4.3 L'immunoproteasoma è espresso in neuroni, astrociti ed endotelio.....	41
4.4 L'immunoproteasoma è espresso maggiormente nelle regioni affette dei pazienti AD.	44
4.5 L'immunoproteasoma e il complesso regolatore PA28 sono espressi nel sistema nervoso centrale di primati non umani.....	46
4.6 Sequenza del messaggero e della proteina LMP2 nei primati non umani.	47
4.7 Elaborazione di un modello strutturale in silico dell'immunoproteasoma 20S umano contenente la sequenza di LMP2 di primati non umani.....	51

4.8	I livelli di espressione delle subunità del proteasoma, immunoproteasoma e PA28 non sono età-dipendenti.	53
4.9	L'attività dei proteasomi non si modifica durante l'invecchiamento.	54
4.10	I livelli di proteine ossidate aumentano nella corteccia frontale di animali anziani.	55
5.	DISCUSSIONE.....	57
6.	BIBLIOGRAFIA.....	66

1.INTRODUZIONE

1.1 La degradazione delle proteine

I livelli di proteine intracellulari sono il risultato del bilanciamento dei processi di sintesi e degradazione, entrambi fondamentali per il corretto funzionamento della cellula. In particolare, la degradazione delle proteine è finemente regolato e si svolge attraverso due vie principali. La prima è rappresentata dai lisosomi, organelli vescicolari contenenti idrolasi acide con diversa specificità, deputati allo smaltimento di proteine endogene costitutive o esogene internalizzate per endocitosi e pinocitosi (Grune, 2000; Ciechanover, 2005). L'altra via proteolitica coinvolge l'**ubiquitina**, un polipeptide di 76 aminoacidi, che funge da marcatore per la degradazione, ed un complesso multienzimatico, il **proteasoma**. Il sistema ubiquitina-proteasoma non richiede compartimentazione ed il complesso catalitico agisce ubiquitariamente (nucleo, citoplasma e in associazione al reticolo endoplasmatico), a pH neutro, con meccanismi, talvolta ATP dipendenti che coinvolgono numerose molecole adiuvanti e che sono state accorpate nel cosiddetto "Signalosoma" (Schwartz et al., 1999).

Il sistema ubiquitina-proteasoma agisce su diverse classi di proteine, sia a breve che lunga emivita, e, essendo responsabile di circa il 90% della degradazione extra-lisosomiale, interviene nella regolazione di numerosi processi cellulari, quali:

- controllo del ciclo cellulare mediante proteolisi di specifiche proteine regolatorie;
- crescita e proliferazione cellulare attraverso la degradazione di oncoproteine e di proteine della via di trasduzione del segnale;
- riparazione del DNA;
- regolazione della trascrizione;
- regolazione della risposta immunitaria ed infiammatoria;
- processazione degli antigeni presentati in associazione con il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I);
- degradazione di proteine mutate o danneggiate (DRiPs).

Poiché il proteasoma interviene in processi di vitale importanza per la cellula, la sua inibizione porta alla morte cellulare e un suo mal funzionamento

può essere alla base di numerosi eventi patologici (Ciechanover, 1998; Hershko et al., 1998).

1.2 L'ubiquitina come segnale per la degradazione

La via proteolitica mediata dal sistema ubiquitina-proteasoma richiede due passaggi distinti: i) il legame covalente di molteplici molecole di ubiquitina alla proteina substrato; ii) la degradazione della proteina ubiquitinata da parte del proteasoma.

L'ubiquitina è una proteina di 76 aminoacidi, molto stabile e conservata durante l'evoluzione, espressa da *loci* che contengono molteplici copie geniche o per fusione con subunità ribosomiali (Grillari et al., 2006, *in press*). Il legame tra l'ubiquitina e la proteina substrato avviene per merito di tre enzimi che agiscono in sequenza. Inizialmente l'ubiquitina viene attivata con un processo ATP-dipendente, catalizzato dall'enzima attivante l'ubiquitina (E1), che prevede la formazione di un legame tioestereo tra la Gly C-terminale dell'ubiquitina ed un residuo di Cys dell'enzima. Una volta attivata, l'ubiquitina, è trasferita ad una Cys del sito attivo dell'enzima coniugante l'ubiquitina (UBC, E2), che la trasporta ad una ligasi, E3, complessata alla proteina substrato. E' questo ultimo enzima che catalizza la formazione di un legame isopeptidico tra il COOH della Gly C-terminale dell'ubiquitina, ed un gruppo amminico ϵ di un residuo interno di Lys della proteina bersaglio. Se questa non contiene Lys, l'ubiquitina viene coniugata all' N-terminale. La reazione viene ripetuta molte volte, e porta alla formazione di una coda omopolimerica di poliubiquitina. Le ubiquitine successive si legano con il carbossile della Gly 76 al gruppo amminico della Lys 48 dell'ultima ubiquitina complessata alla proteina. Questa catena di poliubiquitina, contenente almeno 4 ubiquitine, serve come riconoscimento per il proteasoma 26S, che degrada la proteina e rilascia molecole di ubiquitina che possono essere riutilizzate (Hershko et al., 1998). Recenti dati di letteratura evidenziano come la poliubiquitinazione sugli altri 6 residui di Lys, oltre a Lys 48, presenti all'interno della ubiquitina regoli processi diversi dalla degradazione e che la monoubiquitinazione sia essenziale per il riparo del DNA e l'endocitosi di recettori di membrana (Huang et al., 2006).

Il sistema proteolitico mediato dall'ubiquitina sembra avere una struttura gerarchica: un singolo enzima E1 è responsabile dell'attivazione dell'ubiquitina, mentre almeno 13 specie di E2 sono state caratterizzate e tutte agiscono in associazione con uno o più enzimi E3.

Le ligasi conferiscono specificità al legame tra ubiquitina e proteina substrato, riconoscendone particolari motivi strutturali. Gli enzimi E3 appartengono a due distinte famiglie: i) quelli che contengono il dominio HECT (omologo al dominio carbossi terminale di E6-AP) e che possiedono la Cys catalitica. In questo caso formano un legame covalente con l'ubiquitina prima di trasferirla al substrato; ii) quelli che contengono il dominio RING, comprendente due Cys e due His che coordinano due ioni metallici, e facilitano il trasferimento dell'ubiquitina alla proteina bersaglio, senza la formazione di un intermedio tioestereo (Nandi et al., 2006).

Le proteine che devono essere degradate presentano diversi segnali di riconoscimento per specifiche ligasi: in alcuni casi gli enzimi E3 legano direttamente la proteina bersaglio, riconoscendo residui basici o idrofobici all'estremità amino terminale (regola del N-terminale). Altre volte il legame alla proteina è indiretto, richiede la presenza di una proteina che funge da adattatore tra la proteina substrato e la ligasi.

In alcune proteine che regolano il ciclo cellulare e vengono degradate al termine della mitosi (ciclina mitotiche, proteine inibitrici dell'anafase, proteine associate al fuso) è presente un segnale di degradazione, la "sequenza di distruzione" (*destruction box*), costituita da nove aminoacidi degenerati localizzati a 40-50 residui dall'estremità N-terminale della proteina che è riconosciuta dall'enzima E3 (Schwartz et al., 1999).

Altri tipi di E3, coinvolti nella degradazione di altri regolatori del ciclo cellulare, riconoscono il substrato se fosforilato. Proteine come l'inibitore di NF- κ B, I κ B- α , presentano dei particolari motivi ricchi in Pro, Glu, Ser e Thr (sequenze PEST), che sono riconosciuti e fosforilati da numerose chinasi (**Fig.1**).

Gli enzimi E4, conosciuti anche come fattori di assemblaggio/elongazione (e.g. Ufd2), supportano la formazione di catene polimeriche di ubiquitina.

Oltre agli enzimi ubiquitinanti, sono noti anche enzimi de-ubiquitinanti, appartenenti alla famiglia delle tiol-proteasi, che rilasciano molecole di

ubiquitina da proteine che devono essere degradate e durante la biosintesi dell'ubiquitina stessa.

Questi enzimi riconoscono residui all'estremità C-terminale dell'ubiquitina e sono distinti in due classi:

- 1) Idrolasi dell'ubiquitina carbossi terminale (UCHs)
- 2) Proteasi ubiquitina specifiche (UBPs)

Alla prima appartengono enzimi di circa 25 KDa coinvolti nella maturazione della proubiquitina, e nel rilascio dell'ubiquitina matura da addotti con piccole molecole e/o gruppi amminici e tiolici.

Le UBPs, o isopeptidasi, sono, al contrario, enzimi di circa 100 KDa che catalizzano il rilascio dell'ubiquitina da catene di poliubiquitina libere o coniugate a proteine. Alcuni tipi di UBPs sono libere, altre associate con la subunità 19S del proteasoma; la loro attività catalitica può necessitare o no di ATP (Ciechanover, 1998).

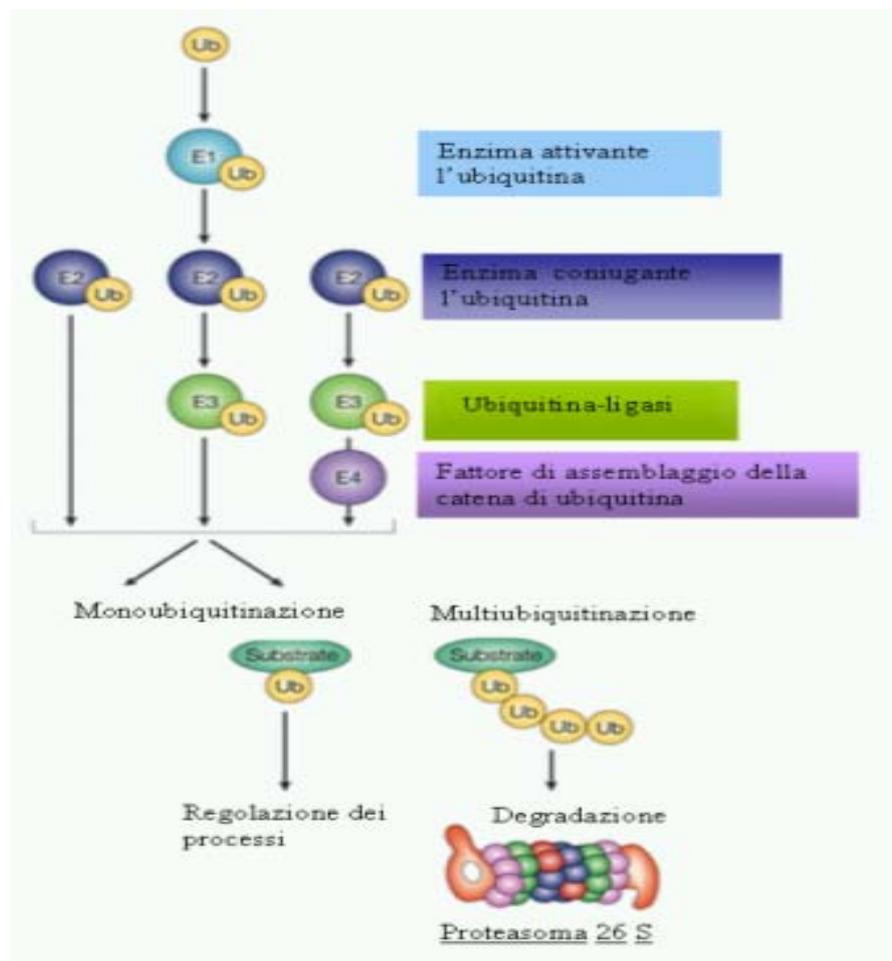


Figura 1. Il processo di ubiquitinazione.

1.3 La struttura del proteasoma 26S

Il proteasoma è un complesso multicatalitico che rappresenta circa l'1-2 % delle proteine cellulari totali, molto stabile (emivita di 120h) e responsabile della maggior parte della proteolisi non lisosomiale delle cellule eucariotiche.

Il proteasoma 26S è costituito da un *core* catalitico centrale, il complesso 20S, associato a due strutture regolatorie 19S (o PA700). Queste ultime sono costituite da una base ed un coperchio; la base si compone di sei subunità con attività ATPasica e due con funzione strutturale, e lega direttamente il *core* catalitico 20S. Otto diverse subunità, tutte eccetto una prive di attività catalitica, costituiscono il coperchio. Il complesso 19S esplica diverse funzioni tra cui il riconoscimento di epitopi conformazionali delle catene di poliubiquitine legate al substrato ed in particolare i residui Leu8, Ile44 e Val70; le subunità S5a e S6' del 19S sono quelle implicate in tale riconoscimento. Inoltre le subunità ATPasiche della base agiscono come chaperonine, facilitando la perdita di elementi di struttura secondaria e terziaria della proteina che deve essere degradata, al fine di facilitarne l'ingresso nella cavità che contiene il sito catalitico. Tale processo avviene in due fasi distinte: l'associazione iniziale e reversibile del 19S con la catena di poliubiquitina, seguito da un legame più stabile con una estremità, ripiegamento o regione non strutturata del substrato. L'unica subunità dotata di attività catalitica del coperchio, denominata POH1, invece idrolizza il legame peptidico tra la catena di poliubiquitina ed il substrato (De Martino et al., 1999; Pickart et al., 2004).

Il *core* 20S è un complesso multicatalitico di circa 700 KDa formato da quattro anelli impaccati in una struttura cilindrica compatta. Ciascun anello si compone di sette subunità, correlate dal punto di vista evolutivo seppure non identiche, suddivise in relazione al grado di omologia in due classi: α e β . I due anelli interni sono costituiti dalle subunità β (β 1- β 7). Le subunità β 1, β 2 e β 5, sono dotate di attività catalitica. Gli anelli esterni, invece, contengono le subunità α (α 1- α 7) che non presentano attività catalitica ma sembrano avere solamente un ruolo strutturale: stabilizzano gli anelli interni, legano le subunità regolatorie e formano un canale (*gate*) attraverso cui entrano i substrati e fuoriescono i prodotti (**Fig. 2**).

Il residuo cataliticamente attivo è una singola Treonina (Thr) all'estremità N-terminale delle tre subunità β sopraelencate; questo caratterizza il proteasoma come proteasi appartenente alla famiglia delle idrolasi nucleofile amino terminali (*amino terminal nucleophile hydrolase*, NTN; EC 3.4.25.1). Le tre Thr attive sono precedute da "pro-sequenze", elementi variabili in lunghezza ed in composizione amminoacidica, che durante l'assemblaggio del proteasoma, sono rimosse con un meccanismo che prevede due tagli: il primo viene effettuato da siti adiacenti che tagliano all'interno della pro-sequenza, il secondo è autocatalitico e genera la Thr attiva ed il proteasoma 20S funzionante (Kloetzel, 2001). Il sito attivo, in questa struttura, si viene a trovare nella cavità interna del cilindro, inaccessibile alle proteine e per questo il proteasoma è un riconosciuto come un complesso auto-compartmentato (Ciechanover, 1998).

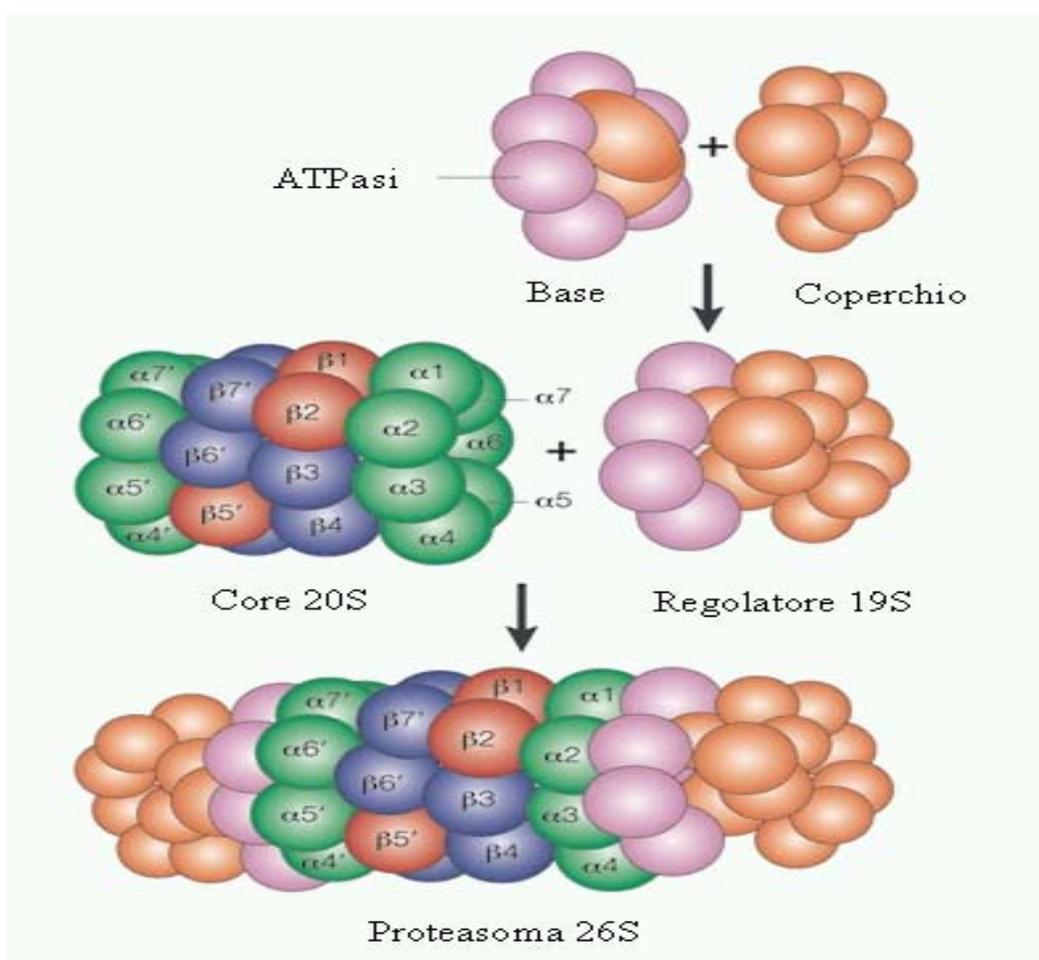


Figura 2. La struttura del proteasoma.

L'assemblaggio del proteasoma è un processo altamente regolato negli eucarioti e i meccanismi ipotizzati sono due. Il primo prevede che le subunità α si assemblino spontaneamente in un anello eptamerico che funge da stampo per le subunità β . Oppure che ciascuna subunità α legghi in maniera specifica una determinata subunità β , facilitando l'interazione con il dimero α/β successivo.

La maturazione del proteasoma negli eucarioti richiede il supporto di proteine addizionali accessorie, che funzionano come chaperonine, tra cui hsc73 e POMP (proteina di maturazione del proteasoma) e che si ritrovano nei precursori ma non nel proteasoma maturo (Kruger et al., 2001; Schmidtke et al., 1997).

Mediante l'utilizzo di substrati fluorogenici, cioè tri- o tetra-peptidi sintetici che vengono riconosciuti e tagliati dal complesso enzimatico generando fluorescenza, sono state caratterizzate le tre attività principali del proteasoma. I peptidi fluorogenici più utilizzati sono:

- succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-metilcumarina,
 Suc-LLVY-AMC (per saggiare l'attività chimotriptica)
- Boc-Leu-Arg-Arg-7-amino-4-metilcumarina, Boc-LRR-AMC
 (per saggiare l'attività triptica)
- Z-Leu-Leu-Glu-7-amino-4-metilcumarina, z-LLE-AMC (attività
 caspasica, PGPH)

Il taglio proteolitico da parte del proteasoma libera il fluorocromo, 7-amino-4-metilcumarina, che è rilevabile al fluorimetro. Questi peptidi possono essere riconosciuti e tagliati anche da altri enzimi come le aminopeptidasi, per questo sono modificati alla loro estremità amino terminale con gruppi protettori (Frisan et al., 2000; Rivett et al., 2002). In questo modo si è stabilito che la subunità $\beta 1$ taglia prevalentemente dopo residui acidi, $\beta 2$ dopo quelli basici e la $\beta 5$ dopo quelli idrofobici, mostrando rispettivamente attività caspasica, triptica e chimotriptica (Dick et al., 1998). Tuttavia, studi condotti *in vitro* con polipeptidi sintetici e proteine hanno dimostrato che, nonostante alcuni siti di taglio siano favoriti rispetto ad altri, il proteasoma è in grado di rompere il legame peptidico in corrispondenza di quasi tutti gli aminoacidi, anche se con minore efficienza per Gly e Pro (Nussbaum et al., 1998), generando frammenti di lunghezza variabile da 3 a 25 aminoacidi.

In seguito al riconoscimento della coda di poli-ubiquitina, le proteine entrano all'interno della cavità catalitica del proteasoma, i prodotti della degradazione, invece, fuoriescono per semplice diffusione. La velocità con cui questi frammenti vengono rilasciati dipende dal grado di apertura del canale costituito dagli anelli α : se il *gate* non è completamente aperto, l'uscita sarà più difficoltosa, specialmente per i frammenti di dimensioni maggiori. Se il canale è completamente aperto, invece, potranno uscire anche frammenti più lunghi. La qualità dei peptidi generati dipende quindi dal tempo di permanenza all'interno del *core* catalitico (Kloetzel, 2001).

Il *core* catalitico ha una struttura molto compatta e probabilmente la regolazione delle tre attività (caspasica, triptica e chimotriptica) viene effettuata mediante meccanismo di tipo allosterico. Studi recenti hanno dimostrato l'esistenza di siti di legame non catalitici, ancora non ben caratterizzati, coinvolti in tale modulazione dell'attività del proteasoma (Schmidtke et al., 2000; Kisselev et al., 2002)

Come precedentemente accennato, una delle funzioni del proteasoma è la produzione di epitopi antigenici presentati in associazione con le molecole di MHC I. Tali frammenti, di circa 8-11 aminoacidi, derivano da proteine estranee (come le proteine virali) ed endogene; in particolare queste ultime rappresentano la sorgente principale di antigeni. Si tratta di proteine danneggiate o ossidate, proteine nascenti con un ripiegamento non corretto, o a breve emivita; infatti circa un terzo delle proteine neo sintetizzate sono degradate dopo 1-2 minuti dalla loro produzione (Goldberg, 2003; Teoh et al., 2004; Strehl et al., 2005). Tuttavia la produzione di epitopi MHC I specifici risulta più efficiente se condotta da una isoforma del proteasoma, denominata immunoproteasoma, che differisce per le tre subunità catalitiche (Kloetzel, 2001).

1.4 L'immunoproteasoma

Una delle caratteristiche della via di presentazione antigenica da parte del MHC I è che molte delle sue componenti sono indotte da citochine infiammatorie come l' Interferone- γ (IFN- γ) e il Fattore di Necrosi Tumorale- α (TNF- α): la catena pesante α della molecola MHC I, le proteine di trasporto

associate alla presentazione antigenica (TAP), diverse aminopeptidasi, il complesso attivatore del proteasoma (*proteasome activator 28*, PA28 o regolatore 11S), ed anche alcune delle subunità β del complesso 20S, con una conseguente alterazione della qualità dei peptidi prodotti dal proteasoma. Nello specifico, le subunità catalitiche $\beta 1$ (Y o δ), $\beta 2$ (Z o ξ) e $\beta 5$ (X o MB1) sono sostituite dalle rispettive immunosubunità: $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1), $\beta 5i$ (LMP7)(Fig. 3).

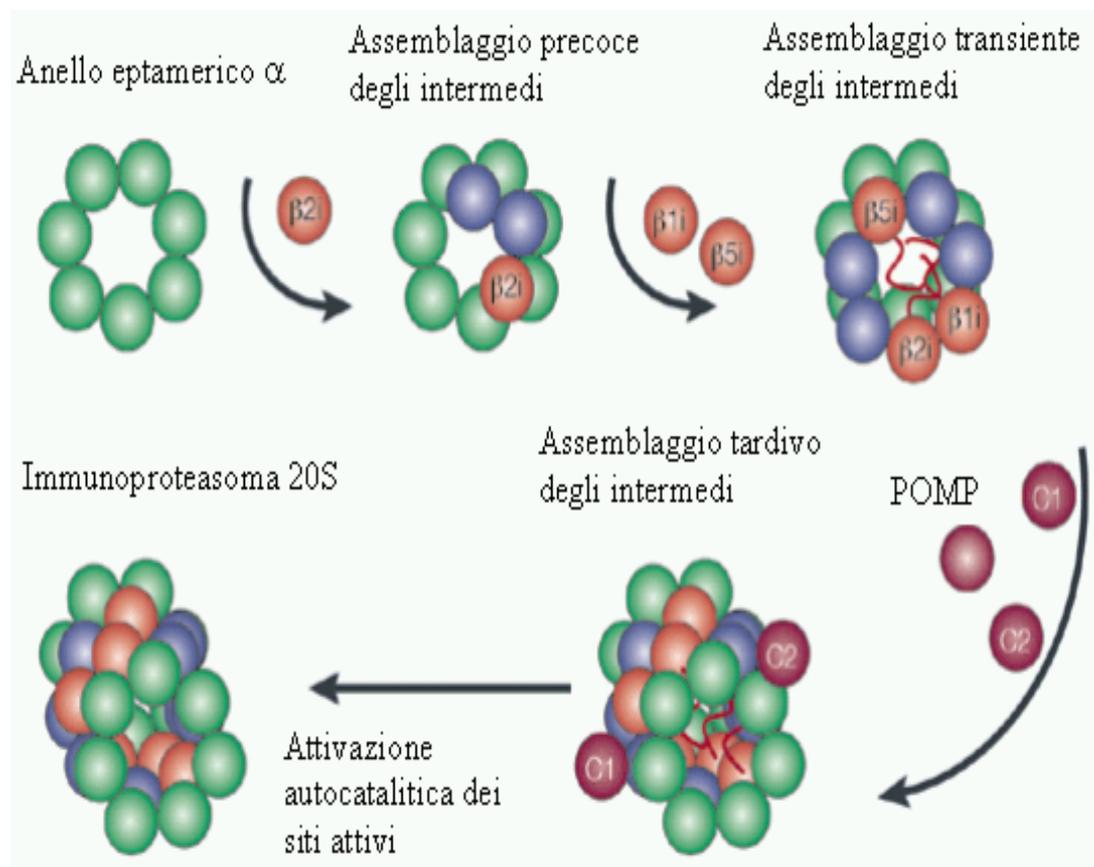


Figura 3. Formazione dell'immunoproteasoma. L'attacco delle subunità β avviene sull'anello eptamerico formato dalle subunità α . Le pro-sequenze (code rosse delle subunità β) hanno una specifica funzione in questo processo e vengono poi rimosse autocataliticamente. Quest'ultimo passaggio avviene all'interno del cilindro completamente assemblato. (C: chaperonine, POMP: proteina di maturazione del proteasoma).

Queste immunosubunità vengono assemblate in nuovi complessi 20S a formare l'immunoproteasoma, con un processo cooperativo: $\beta 2i$ è incorporata solo se è presente $\beta 1i$, mentre $\beta 1i$ è assemblata indipendentemente dalla presenza di $\beta 2i$. La subunità $\beta 5i$ sembra supportare ed influenzare la cinetica di formazione di questo nuovo complesso multicatalitico (Kloetzel, 2001). L'immunoproteasoma, rispetto al proteasoma, ha una capacità maggiore di generare peptidi con residui idrofobici o basici all'estremità C-terminale (Toes et al., 2001) che sono favoriti nel legare con maggiore affinità le molecole MHC I (Rock et al., 1999). Infatti LMP2 inibisce il taglio dopo residui acidi mentre LMP7 favorisce il taglio dopo aminoacidi basici o idrofobici, aumentando rispettivamente l'attività triptica e chimotriptica dell' immunoproteasoma (Gaczynska et al., 1996). Poiché le molecole di MHC I legano preferibilmente peptidi di 8-11 residui amminoacidici, con residui idrofobici al C-terminale, l'incorporazione di LMP2 e LMP7 nell'immunoproteasoma porta alla formazione di frammenti più affini alla presentazione antigenica. Si è ipotizzato che tali subunità modifichino la qualità dei peptidi alterando la struttura del canale di trasporto del substrato all'interno del core 20S del proteasoma e la specificità di legame. La maggior parte degli epitopi antigenici vengono prodotti come precursori dal proteasoma, con il corretto C-terminale ma con un'estensione all' N terminale, che favorisce anche il legame alle proteine TAP e che è rimossa da aminopeptidasi presenti nel citoplasma (tra cui la TPPII) o nel reticolo endoplasmatico (ERAP1) (Kloetzel, 2004). Circa l'1% dei peptidi prodotti dal sistema ubiquitina-proteasoma risulta, alla fine di tutti i processi accessibile al sistema immunitario (Yewdell et al., 2003).

1.5 Il complesso regolatore PA28

Come le sopraccitate subunità catalitiche, anche il complesso regolatore PA28 è indotto dall'IFN- γ , anche se espresso costitutivamente a bassi livelli in molti tessuti, tra cui anche il cervello (Noda et al., 2000). Il PA28, REG o 11S, è composto da due subunità, PA28 α e PA28 β , organizzate in un complesso

eptamerico $\alpha_3\beta_4$ di circa 180-200 KDa. Tali subunità si sono originate per duplicazione e divergenza dal gene che codifica per PA28 γ , una proteina (nota anche come antigene Ki) a localizzazione prevalentemente nucleare, espressa ad alti livelli nel cervello e dotata di attività anti-apoptotica (Rechsteiner et al., 2005).

Il PA28 si lega in maniera ATP indipendente agli anelli esterni del proteasoma 20S; la sua espressione è collegata ad un aumento dell'efficienza di presentazione di alcuni antigeni, ma non influenza il ricambio delle altre proteine cellulari, né favorisce l'assemblaggio dell'immunoproteasoma. Recenti studi di cinetica illustrano come il PA28 aumenti l'affinità del proteasoma per le proteine substrato, senza modificare l'attività massimale del complesso enzimatico, bensì favorendo l'ingresso delle proteine da degradare e il rilascio dei prodotti. Nel *core* 20S privo di subunità regolatorie, le code amino terminali delle subunità α (in particolare α_3) si proiettano all'interno della cavità catalitica, bloccandone l'accesso; diversamente, il legame delle subunità 19S e PA28 al 20S porta all'apertura del canale. Nel caso delle subunità 19S il processo richiede energia, il legame del PA28 invece determina un piegamento delle code delle subunità α all'insù, l'apertura massimale del canale in assenza di ATP ed il rilascio di polipeptidi più lunghi (**Fig. 4**) (Kloetzel, 2001). All'interno della cellula la presenza contemporanea del PA28 e del regolatore 19S porta alla formazione di complessi ibridi 19S-20S-PA28, che rappresentano circa il 25% dei proteasomi totali. La presenza di questa particolare forma di proteasoma, insieme all'espressione dell'immunoproteasoma in seguito all'azione di IFN- γ , sarebbe responsabile della produzione di peptidi diversi da quelli generati dal 26S contenente solamente il 19S (Cascio et al., 2002).

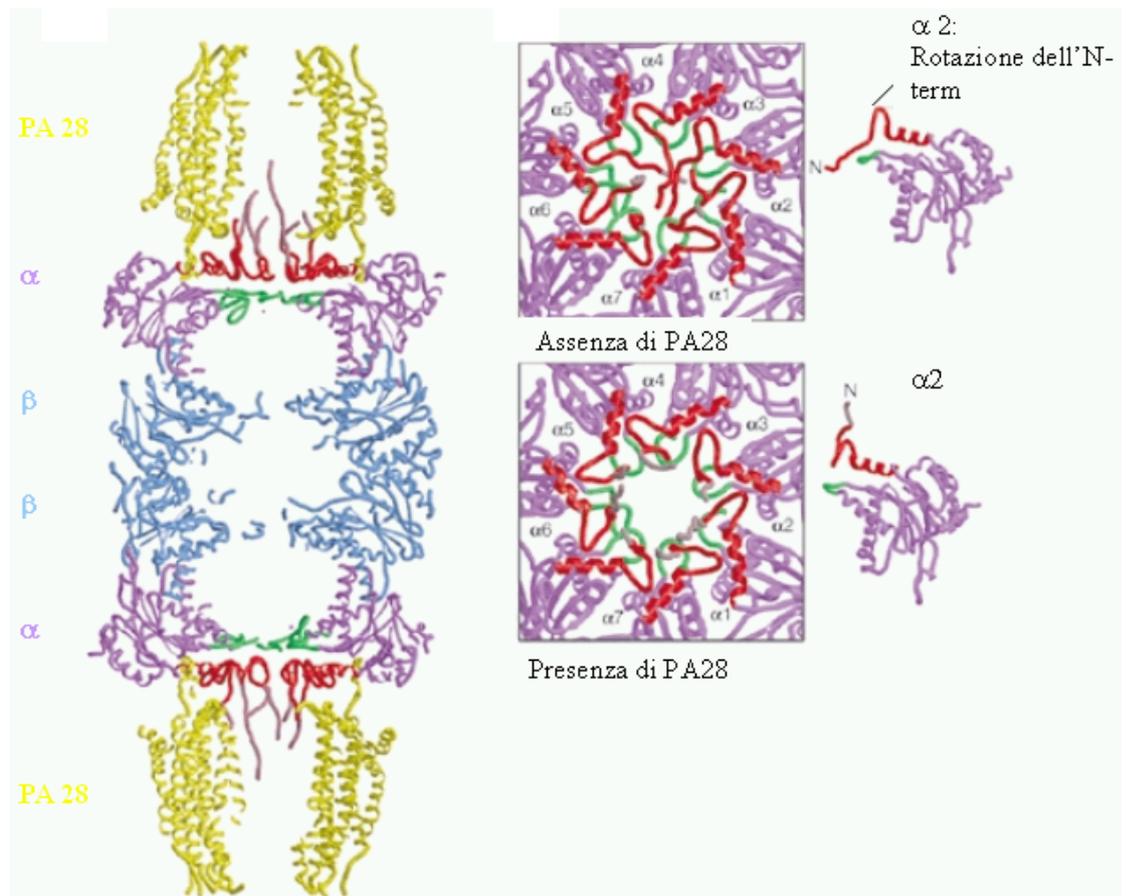


Figura 4. Effetto di PA28 sul canale. Tale complesso si lega in una tasca all'interfaccia tra le subunità α ed esercita una pressione sulle code N-terminali delle subunità α facendole ruotare all'insù; in questo modo il canale si libera.

1.6 I geni LMP ed i loro polimorfismi

I geni per le immunosubunità LMP2 e LMP7 (*low molecular mass polypeptide*, LMP, conosciuti anche come *psmb9* e *8* rispettivamente) sono situati in posizione p21.3 sul cromosoma 6, insieme alle proteine TAP 1 e 2, all'interno della regione codificante per il complesso MHC di classe II (Tanaka et al., 1997). Sia per LMP2 che per LMP7 si conoscono due forme di mRNA (Glynne et al., 1993; Singal et al., 1995); inoltre entrambi i geni presentano un polimorfismo biallelico:

- nel gene LMP2, una sostituzione non conservativa A/G in un nucleotide del codone 60 porta agli alleli Arg (LMP2.1) o His (LMP2.2),

- nella posizione nucleotidica 145 dell'esone 2 del gene LMP7, una trasversione A-C converte una Gln (LMP7.1) in Lys (LMP7.2). (Lim et al., 1999; Vinasco et al., 1998).

Sono stati realizzati numerosi studi di genetica che hanno dimostrato un'associazione tra i polimorfismi dei geni LMP2 e LMP7 ed alcune patologie autoimmuni quali l'artrite reumatoide, la spondilite anchilosante e il diabete mellito insulina-dipendente (Maksymowich et al., 1995; Deng et al., 1995; Pryhuber et al., 1996; Lim et al., 1999; Maksymowich et al., 2000). Inoltre abbiamo direttamente osservato un'influenza del polimorfismo di LMP2 sulla suscettibilità all'apoptosi indotta da TNF- α , in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) (Mishto et al., 2002).

1.7 Il proteasoma nel sistema nervoso centrale

Nonostante i progressi compiuti negli ultimi anni per la comprensione del ruolo del sistema ubiquitina-proteasoma nell'omeostasi cellulare, la caratterizzazione dell'espressione ed attività del proteasoma nel sistema nervoso centrale (SNC) risulta molto frammentaria. E' noto che tale complesso multicatalitico media la degradazione di proteine di particolare importanza per la sopravvivenza neuronale quali le cicline, p53, le preseniline, la proteina precursore dell'amiloide (APP), la parkinina, la proteina basica della mielina (MBP), gli aggregati proteici e le proteine ossidate. La degradazione degli istoni e di alcuni fattori di trascrizione o regolatori della trascrizione sottolineano il ruolo del proteasoma nel mantenere l'omeostasi nucleare (Keller et al., 2002; Collins et al., 2006). L'espressione dell' ubiquitina e del proteasoma alle terminazioni sinaptiche, oltre che a livello citosolico e nucleare, ne fa supporre il ruolo centrale nello sviluppo delle connessioni neuronali, nella trasmissione dell'impulso nervoso e nella plasticità sinaptica. A questo riguardo, è stata elaborata una teoria secondo cui, a livello post-sinaptico, ci siano gruppi di proteine co-regolate dallo stato di ubiquitinazione di alcune "molecole organizzatrici" ad azione strutturale, la cui degradazione comporterebbe la destabilizzazione di tutte le altre (Ehlers 2003; DiAntonio et al., 2004).

Per quanto riguarda l'espressione e la composizione del proteasoma nel SNC, alcuni studi hanno messo in evidenza un' elevata variabilità tra le diverse aree cerebrali (Noda et al., 2000; Ding et al., 2001); in particolare i neuroni piramidali della corteccia e l'ippocampo sono quelli con il più alto contenuto di proteasoma (Mengual et al., 1996). Solo negli ultimi anni inoltre è stata evidenziata l'espressione delle immunosubunità in reperti autoptici di cervello umano (Piccinini et al., 2003) insieme alle subunità costitutive. Lo stesso risultato è emerso in uno studio condotto su reperti autoptici di soggetti affetti dalla malattia di Huntington (Diaz-Hernandez et al., 2003).

Anche se poche informazioni sono disponibili riguardo ai fattori che regolano la trascrizione dei componenti del proteasoma, alcuni studi evidenziano una regolazione coordinata di più subunità (Xie et al., 2001; Meiners et al., 2003). In particolare, da un' analisi bioinformatica, seguita da studi *in vitro* e su roditori è emerso che nei neuroni l'espressione dei geni *psmb8* (LMP7), *psmb9* (LMP2), *psme1* (PA28 α), *psme2* (PA28 β), *psmc4* (S6b), *Tap1*, oltre che di alcuni enzimi ubiquitinanti E2 ed E3, sono regolati dal fattore di trascrizione Zif268 (Egr1/Krox24/NGF-IA), espresso in seguito ad alcuni fenomeni connessi all'attività neuronale come il potenziamento a lungo termine (James et al., 2005; James et al., 2006).

1.8 L' invecchiamento

Negli ultimi decenni sono stati condotti numerosi studi finalizzati all'identificazione del cosiddetto "gene della longevità", cioè di uno o più geni strettamente correlati alla probabilità di diventare longevi. Tali studi si sono indirizzati verso numerosi meccanismi o ambiti biologici. Il professore Franceschi in particolare si è interessato dell'aspetto immunologico, approdando a importanti risultati che gli hanno permesso di sviluppare, in concomitanza con altri gruppi, la cosiddetta teoria dell'*Inflammaging*, secondo cui l'invecchiamento sarebbe caratterizzato da uno stato pro-infiammatorio cronico. Ciò deriva in parte da un sostanziale rimodellamento del sistema immunitario durante l'invecchiamento (*Immunosenescenza*); in particolare si modificano gli equilibri tra immunità innata e immunità adattativa, a discapito di questa ultima

(Franceschi et al., 2000a; Franceschi et al., 2000b). Negli anziani, infatti, è stata riscontrata una diminuzione delle cellule CD4+ e CD8+ native ed un'espansione di cellule T e B di memoria, specifiche per antigeni di infezioni virali croniche quali Citomegalovirus. Al contrario l'immunità innata (macrofagi, cellule NK, complemento e cellule dendritiche) viene preservata e in alcuni casi addirittura accentuata. L'anziano inoltre presenta un innalzamento dei livelli basali sierici di citochine quali IL-6, TNF- α , IFN- γ , a sottolineare la presenza di uno stato pro-infiammatorio cronico che caratterizza l'invecchiamento (Fagiolo et al., 1993).

Per quanto riguarda le modificazioni del sistema nervoso centrale durante l'invecchiamento, studi condotti sull'uomo e su modelli animali hanno messo in evidenza numerosi cambiamenti età associati, anche se a volte i loro effetti possono essere mascherati da reazioni compensatorie, che risultano essere spesso area-specifici. Sono stati descritti in particolare una diminuzione del numero di neuroni, l'atrofia delle loro connessioni e la degenerazione delle cellule gliali, riconducibili ad una diminuzione dell'apporto di sangue al cervello, causata da aterosclerosi e depositi amiloidei all'interno dei vasi. La perdita di sinapsi e l'alterazione nei sistemi di neurotrasmissione si riscontrano nell'invecchiamento fisiologico ed, in modo più grave, in numerose patologie neurodegenerative (Bretoni-Freddari et al., 2006). Variazioni nel metabolismo energetico e una diminuzione dell'attività mitocondriale età-associate a loro volta influenzano processi vitali come l'omeostasi del calcio e favoriscono lo sviluppo di placche senili (SP) e grovigli intracellulari della proteina Tau iperfosforilata (PHF-Tau) (Bertoni-Freddari et al., 2006). L'alterazione della competenza mitocondriale è responsabile anche dell'incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che sono i principali responsabili del danno ossidativo a carico di DNA, RNA e proteine (Lu et al., 2004). In particolare l'accumulo di proteine ossidate e di pigmenti fluorescenti derivati dal metabolismo cellulare caratterizzano l'invecchiamento di diversi tessuti, tra cui anche il cervello (Grune et al., 2004). Un recente studio ha mostrato per la prima volta come il danno ossidativo sia incrementato nel giro temporale medio e superiore, ma non nel cervelletto, di soggetti affetti da lieve deficit cognitivo (MCI), una condizione, che se stabile, rappresenta una fase precoce dell'AD (Keller et al., 2005; Keller, 2006). In particolare, l'aumento età-dipendente delle proteine ossidate risulta essere cellula-specifico: le cellule post-mitotiche

(neuroni) presentano livelli di tali specie molto più alti rispetto a quelle mitotiche (microglia) e più del 40% del contenuto totale di proteine neuronali è ossidato, come normale decorso dell'invecchiamento (Keller et al., 2004)

Inoltre, se fino a pochi anni fa il SNC veniva considerato un organo immunologicamente privilegiato, per la presenza della barriera ematoencefalica e il microambiente immunosoppressivo, diversi studi hanno evidenziato come anche nel cervello sia possibile una risposta immunitaria (Xiao et al., 1998). Questa ultima, durante l'invecchiamento, diversamente a quanto accade in periferia, risulta essere incrementata, come dimostrato dall'attivazione degli astrociti, dall'aumento della fagocitosi e dall'espressione dei complessi MHC I e II nella microglia, la sintesi di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β e TNF- α), di chemochine e la presenza di proteine del complemento (Lee et al., 2000; Terao et al., 2002).

1.9 Il sistema ubiquitina-proteasoma nell'invecchiamento

Anche il sistema ubiquitina-proteasoma subisce numerose modificazioni durante il processo di invecchiamento, come suggeriscono diverse evidenze sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare, gli studi fino ad ora pubblicati, anche se con discrepanze spesso dovute ai diversi modelli cellulari e animali considerati, hanno osservato principalmente alterazioni a carico del proteasoma rispetto alla cascata dell'ubiquitinazione (**Fig. 5**). Infatti non sono state descritte variazioni nel contenuto totale di ubiquitina libera e nell'attività degli enzimi ubiquitinanti, anche se durante l'invecchiamento le proteine poliubiquitinate si accumulano (Gaczynska et al., 2001; Gray et al., 2003; Martinez-Vicente et al., 2005). Diversamente, il proteasoma subisce modificazioni a vari livelli:

- i) la diminuzione dell'attività del proteasoma è stata descritta in diversi tessuti umani quali muscolo (Husom et al., 2004; Ferrington et al., 2005), linfociti (Ponnappan et al., 1999; Carrard et al., 2003), cheratinociti e fibroblasti (Bulteau et al., 2000). Tuttavia, questi ultimi, se derivati da persone centenarie, mantengono preservata l'attività del proteasoma (Chondrogianni et al., 2000).

L'inibizione dell'attività proteolitica del proteasoma è stata descritta anche in modelli animali (topi, ratti e alcuni primati non umani) e cellule in coltura che vanno incontro a senescenza (Chondrogianni et al., 2003). Anche se tutte e tre le diverse attività risultano essere colpite, quella caspatica risulta essere maggiormente inibita. In alcuni studi è stato evidenziato che la perdita di attività proteolitica si accompagna ad una diminuzione del contenuto di alcune subunità, in particolare quelle β , che risulterebbero essere il fattore limitante nella sintesi del proteasoma (Bulteau et al., 2000; Chondrogianni et al., 2003). Poche informazioni sono disponibili riguardo alle modificazioni dell'immunoproteasoma con l'invecchiamento. Mentre uno studio condotto su linfociti umani di donatori di diversa età non ha mostrato nessuna variazione nei livelli di LMP2 ed LMP7 (Carrard et al., 2002), è stato descritto un aumento dell'immunoproteasoma ed una diminuzione del proteasoma costitutivo nel muscolo di ratti vecchi rispetto ai giovani (Husom et al., 2004; Ferrington et al., 2005). Non ci sono invece informazioni sulle modificazioni dell'attività del solo immunoproteasoma, per la mancanza di saggi adeguati.

- ii) Numerose modificazioni post-traduzionali si riscontrano in specifiche subunità del proteasoma, ad indicare che non si tratta di un fenomeno stocastico. Si registra in particolare un aumento età-dipendente del grado di ossidazione, ubiquitinazione, glicazione e coniugazione con lipidi perossidati, che alterano l'attività del complesso catalitico. Mentre il 19S ed il 20S risultano essere ubiquitinati allo stesso livello, il *core* catalitico subisce maggiormente glicazione e coniugazione con lipidi ossidati, tra cui la specie più reattiva, il 4-idrossi-2-nonenale (HNE). Queste modificazioni tuttavia non modificano il processo di assemblaggio del 26S, non essendoci infatti differenze nel rapporto 26S/20S durante l'invecchiamento (Carrard et al., 2003; Mishto et al., 2003)
- iii) E' noto che il proteasoma 20S è il principale responsabile della degradazione ubiquitina e ATP indipendente delle proteine ossidate (Davies, 2001) e bassi livelli di stress ossidativo ne modificano la struttura e ne incrementano l'attività (Ding et al., 2003), anche attraverso l'induzione di chaperonine come le HSP. Tuttavia la presenza di quantità

elevate di proteine ossidate e la formazione di aggregati intracellulare, tipici dell'invecchiamento, hanno un'azione inibente, principalmente per il loro legame al *core* catalitico e blocco dell'accesso dei substrati. E' stato evidenziato inoltre che il proteasoma 20S, ed in particolare quello costitutivo (Amici et al., 2003), è più resistente del 26S allo stress ossidativo (Reinheckel et al, 1998), come dimostrato dall'accumulo di proteine poliubiquitinate, e che la subunità LMP2 risulta di fondamentale importanza per l'eliminazione di proteine ossidate e la sopravvivenza cellulare (Hayashi et al., 2000; Ding et al., 2006a).

Poche informazioni sono invece disponibili riguardo alle modificazioni età-associate di proteine accessorie, come hUMP1/POMP e hsc73, che mediano l'assemblaggio e la maturazione del proteasoma, e di altre molecole ad attività regolatoria, come il PA200 e PARP (Chondrogianni et al., 2005).

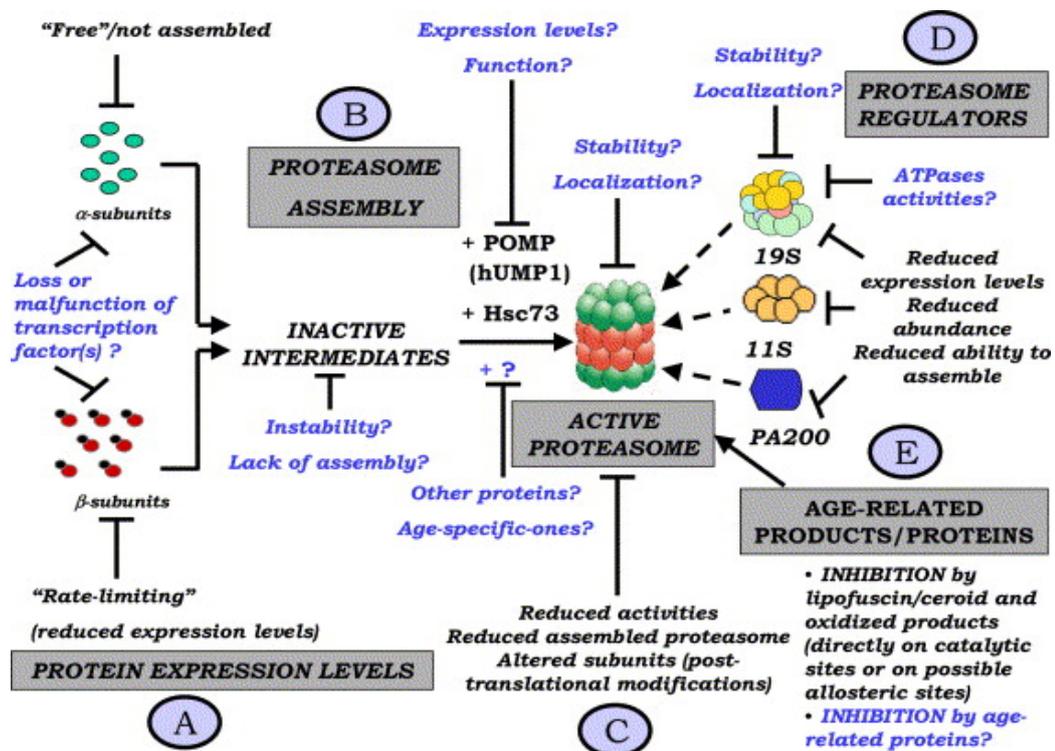


Figura 5. Fattori coinvolti nell'alterazione dell'attività del proteasoma durante l'invecchiamento. Da Chondrogianni et al., 2005.

1.10 Il sistema ubiquitina-proteasoma nell'invecchiamento cerebrale

Molte modificazioni del sistema-ubiquitina proteasoma sopra descritte durante l'invecchiamento si riscontrano anche nel sistema nervoso centrale, anche se i risultati ottenuti variano in relazione al modello utilizzato. In particolare sono stati descritti uguali livelli di ubiquitina libera, nessuna variazione nell'attività dell'enzima E1, poche informazioni riguardo agli enzimi della classe E2 ed E3, ed un aumento dei livelli di proteine poliubiquitinate, più marcato nel cervelletto e tronco cerebrale, rispetto alla corteccia (Gray et al., 2003). Inoltre è stata descritta anche una forma di ubiquitina mutata, l' Ub⁺¹, che si forma per un fenomeno di *misreading* molecolare e genera una proteina con un carbossi-terminale incapace di effettuare la coniugazione con il substrato bersaglio; tuttavia l'Ub⁺¹ può subire poliubiquitinazione, dando origine a polimeri di ubiquitina libere che hanno un'azione inibente sul proteasoma. Tale forma si riscontra sia in soggetti anziani non dementi, che in pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer's (AD) e sindrome di Down (Van Leeuwen et al., 2002).

Per quanto riguarda le informazioni sull'attività enzimatica del proteasoma nel SNC, i dati riportati in letteratura risultano essere spesso contrastanti. Una diminuzione età-associata dell'attività del proteasoma è stata riportata nell'ippocampo, corteccia, cervelletto, tronco encefalico e midollo spinale di ratti anziani, anche se con andamento diverso, indicando una suscettibilità area-specifica (Keller et al., 2000b). Lo stesso risultato è stato ritrovato in un'altra indagine condotta in topi, ratti e piccole scimmie della specie *Callithrix Jaccus* (Zeng et al., 2005). Diversamente uno studio effettuato su ratti ha mostrato un aumento dei livelli di proteine ossidate nell'ippocampo di animali anziani, ma non nella corteccia e cervelletto, e nessuna variazione età-associata nell'attività del proteasoma (Abd El Mohsen et al., 2005). Un'altra indagine condotta invece su topi ha evidenziato un aumento età-associato dei livelli di alcune subunità del proteasoma e nessuna differenza nell'attività del complesso 20S; parallelamente è invece descritta una diminuzione dell'attività del 26S e un incremento nei livelli di proteine ossidate negli animali anziani (Ding et al., 2006a). Inoltre, a sottolineare l'importanza di LMP2, è emerso che topi *knock-out* per tale

immunosubunità presentano una diminuzione dell'attività sia del 20S che del 26S e un aumento dei livelli di proteine ossidate nel cervello. Questi dati mostrano quindi come il proteasoma agisca ad un secondo livello nel prevenire l'accumulo di proteine ossidate e che diversi fattori contribuiscono alla loro formazione (Ding et al., 2006a). Quando però i meccanismi pro-ossidanti e di difesa risultano essere sbilanciati, come nell'invecchiamento e in alcune patologie neurodegenerative, l'inibizione del proteasoma è un meccanismo che favorisce l'ulteriore accumulo di proteine ossidate e la formazione di aggregati, con gravi alterazioni all'omeostasi neuronale. In particolare, si verifica un accumulo intracellulare di lipofuscina e scarti del metabolismo cellulare, un'induzione dell'autofagia (Rubinsztein, 2006), un'alterazione dell'espressione di geni fondamentali in molte patologie neurodegenerative (Ding et al., 2004), un aumento della suscettibilità all'apoptosi indotta da TNF- α e un'inibizione dapprima reversibile e poi irreversibile della sintesi proteica (Ding et al., 2006b e c), anche se tali risposte risultano essere cellula-specifiche.

Come già accennato, molte delle modificazioni età-associate che riguardano il proteasoma nel SNC si ritrovano in numerose patologie neurodegenerative, tra cui la malattia di Alzheimer. Nell'AD la riduzione dell'attività proteolitica colpisce diversamente le varie regioni dell'encefalo: un calo significativo è stato osservato nell'ippocampo, nel giro temporale medio e superiore e nel lobulo parietale inferiore (Keller et al., 2000a), regioni più colpite dalle lesioni caratteristiche della patologia e dalla conseguente degenerazione neuronale, mentre, non pare essere affetta nel lobo temporale, nello striato (Keck et al., 2003), nel cervelletto e nell'area occipitale (Keller et al., 2000a). Nell'inibizione dei proteasomi sembrano intervenire diversi fattori concomitanti come: i grovigli intracellulari della proteina tau iperfosforilata mediante legame al *core* 20S (Keck et al., 2003), i frammenti che si originano dal taglio della proteina precursore della proteina amiloide (APP) (Checler et al., 2000) e la forma mutata dell'ubiquitina, l'Ub⁺¹. Tale inibizione può avere conseguenze dirette sulla omeostasi neuronale, sulla maturazione delle Preseniline 1 e 2 e sulla corretta processazione della β -Amiloide, avendo il proteasoma un'attività secretasica e partecipando alla maturazione delle preseniline (Checler et al., 2000). Poiché è noto che la degenerazione neuronale concorre all'induzione di

uno stato pro-infiammatorio cronico, con l'espressione di citochine quali IFN- γ e TNF- α , che modulano la composizione e attività del proteasoma e un recente studio *in vitro* ha mostrato come l'immunoproteasoma abbia un velocità di degradazione della proteina tau fosforilata 10 volte maggiore rispetto alla controparte costitutiva (Cardozo et al., 2002), l'eventuale aumento dell'espressione di immunoproteasoma nelle regioni affette potrebbe quindi rappresentare una reazione compensatoria alla perdita di attività e servire, almeno inizialmente, a contrastare l'accumulo dei PHF-tau.

1.11 I primati non umani come modello per l'invecchiamento

Gli studi sull'invecchiamento cerebrale umano sono fortemente limitati dalla difficoltà di reperire materiale biologico. Spesso inoltre i risultati ottenuti da indagini *post-mortem* sono inficiati da alcuni fattori come le condizioni del paziente al momento del decesso, il tempo intercorso fino all'autopsia e la conservazione del tessuto. Anche se studi *in vitro* e su roditori hanno messo in evidenza la diversa suscettibilità di specifici tipi neuronali e circuiti alle modificazioni età-associate, modelli animali più vicini all'uomo risulterebbero più adeguati per comprendere l'invecchiamento fisiologico e gli eventi precoci legati allo sviluppo di diverse patologie, tra cui quelle neurodegenerative come l'AD (Kimura et al., 2003; Kimura et al., 2005). A questo scopo, diversi studi vengono condotti su primati non umani, in particolare quelli delle specie *Macaca Mulatta* e *Macaca Fascicularis*. Il decorso della loro vita, compresa la menopausa, è molto simile a quello dell'uomo, anche se la scala temporale è ridotta (durata media della vita è 25 anni, massima età raggiungibile circa 40 anni). Inoltre, a partire dai 20 anni di vita, il loro cervello va incontro a modificazioni senili quali l'allargamento dei neuriti, la deposizioni di amiloide, la presenza di microglia reattiva attorno alle placche e l'alterazione dei circuiti di neurotrasmissione, simili a quelle riscontrate nell'invecchiamento cerebrale umano e nell'AD (Martin et al., 1994; Lane, 2000; Bertoni-Freddari, 2006). Inoltre, studi di genomica ed espressione genica hanno evidenziato che tali primati condividono con l'uomo più del 90% dei geni (Lane, 2000) e che il 45% dei geni espressi nella corteccia prefrontale sono comuni nelle due specie. Tra

questi se ne ritrovano alcuni cardine come le preseniline, la proteina precursore dell'amiloide, la proteina tau e l'ubiquitina (Marvanovà et al., 2003). Anche se il genoma di queste specie di primati non umani non è stato ancora sequenziato completamente, per quanto riguarda il sistema ubiquitina-proteasoma, sono riportate nella banca dati NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov/) ed in letteratura (Wang et al., 2004) le sequenze codificanti per alcune subunità del proteasoma nella specie *Macaca Mulatta* e *Fascicularis*. Tuttavia, sono nulle le informazioni riguardanti l'espressione, l'attività ed il ruolo del proteasoma e dell'immunoproteasoma nell'invecchiamento cerebrale in tale modello animale e sarà scopo di questa tesi indagarle.

2. SCOPO DELLA TESI

Nei tre anni di studio del dottorato in Patologia Sperimentale ho investigato, grazie al prezioso contributo del Dr. Michele Mishto, della Dr. Aurelia Santoro, e di altri collaboratori italiani e stranieri, il ruolo del sistema ubiquitina-proteasoma nell'invecchiamento cerebrale, concentrando in particolare la mia attenzione sull'immunoproteasoma.

A partire dagli anni ottanta sono diventati sempre più numerosi gli studi rivolti alla caratterizzazione della struttura e funzione del proteasoma, così come della sua variante immunologica immunoproteasoma, in diversi sistemi biologici. Tali indagini hanno evidenziato il ruolo centrale di questo complesso multicatalitico nella regolazione di diversi processi cellulari, grazie alla degradazione selettiva di un numero altissimo di proteine, tra cui anche quelle difettose o modificate, il cui numero aumenta in modo significativo durante l'invecchiamento. Per quanto riguarda il sistema nervoso centrale, se da un lato il ruolo del proteasoma è stato parzialmente delineato, nonostante numerose difficoltà legate alla complessità del tessuto, solo di recente scoperta è stata l'espressione dell' immunoproteasoma nel cervello umano, e a questa ha contribuito anche lo studio qui presentato. Tuttavia le informazioni riguardanti il coinvolgimento dell'immunoproteasoma nel mantenere l'integrità del sistema nervoso centrale, nell'invecchiamento fisiologico e patologico sono ancora molto scarse.

All'interno di questo scenario quindi lo studio qui presentato è stato indirizzato ad elucidare il ruolo dell'immunoproteasoma nell'invecchiamento cerebrale fisiologico, includendo in parte anche ad una delle principali malattie neurodegenerative età-correlate, la Malattia di Alzheimer. Su reperti autoptici cerebrali di soggetti giovani ed anziani non affetti da demenza e pazienti affetti da AD sporadico abbiamo indagato l'espressione, la localizzazione e l'attività dell'immunoproteasoma. La stessa indagine è stata condotta anche su diverse aree del sistema nervoso centrale di primati non umani della specie *Macaca Fascicularis*. Abbiamo scelto tale modello animale perché rispetto ad altri ha il vantaggio di essere più vicino filogeneticamente all' *Homo Sapiens* e diversi studi hanno evidenziato come l'invecchiamento cerebrale in tale specie di primati presenti numerose similitudini con quello umano. Inoltre, abbiamo concentrato la nostra attenzione su LMP2, dato il suo ruolo centrale nel regolare l'attività dell'immunoproteasoma. Per questo abbiamo sequenziato l'RNA

messaggero di tale subunità catalitica e, dopo aver ottenuta la composizione amminoacidica, abbiamo elaborato un modello strutturale *in silico* dell'immunoproteasoma 20S contenente la proteina LMP2 di primati, all'interno del *core* umano.

3. MATERIALI E METODI

Campioni di tessuto cerebrale

Sono stati esaminati campioni di tessuto cerebrale autoptico proveniente da 12 soggetti anziani non affetti da demenza (Braak stage 0-1, secondo Braak et al. 1991; età media 70.2, intervallo 50-86 anni), 6 soggetti giovani non affetti da demenza (Braak stage 0-1; età media 42, intervallo 40-50 anni) e 10 pazienti affetti da AD (Braak stage 5-6; età media 70.3, intervallo 49-84 anni). In tutti i campioni raccolti l'intervallo temporale relativo al prelievo del materiale autoptico è di 4-41 ore. Sono stati raccolti 12 ippocampi da soggetti anziani non dementi (K) e 6 da giovani (Y). Dai cervelli di pazienti affetti da AD sono stati raccolti 10 aree ippocampali (HPG-AD) e 10 cerebellari (CBL-AD); tutti i campioni sono stati conservati a -80°C . Il materiale biologico è stato fornito dal Dr. T. Grune, afferente all'Università Heinrich Heine di Duesseldorf (D).

Per lo studio sui primati non umani della specie *Macaca Fascicularis*, abbiamo analizzato il tessuto cerebrale autoptico proveniente da 7 animali adulti (età media 10.1 anni, intervallo 10-11 anni) e 6 animali anziani (età media 19.5, intervallo 16-23 anni). Gli animali sono stati allevati ed utilizzati presso la sede di Roma del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR). Dopo anestesia (10 mg/kg di Ketamina cloridrato i.m.), gli animali sono stati sacrificati con una iniezione intravenosa di Tanax (T-61) e sottoposti immediatamente all'espanto del cervello. Sono state sezionate 3 diverse aree da ciascun animale: corteccia frontale (CxF), corteccia temporale (CxT) e cervelletto (CBL), tutte conservate a -80°C fino all'utilizzo. I campioni sono stati forniti dal Dr. C. Bretoni-Freddari, appartenente all'Istituto Nazionale di Ricerca sull'Invecchiamento (INRCA) di Ancona.

Quantificazione delle proteine.

I campioni di tessuto cerebrale sono stati omogeneizzati utilizzando un pestello e ripetuti cicli di congelamento/scongelo e successivamente lisati in un buffer contenente KAc 80mM, MgAc 5 mM, Hepes 100mM pH=7.2, DTT 1mM, Triton X 0.1%. Il materiale insolubile è stato rimosso mediante centrifugazione a 15000 g per 10' a 4°C ; il soprannatante, contenente le proteine, è stato conservato in aliquote a -80°C e quantificato usando la colorazione con Coomassie Blue. Le proteine sono state separate in un gel 12% SDS-poliacrilammide, colorate con una soluzione al 50% di metanolo, 10% di acido

acetico, 0.25% di Coomassie Brilliant Blue R250, per 12h a 4°C e successivamente decolorate in una soluzione al 50% di metanolo, 7% di acido acetico per 4h a temperatura ambiente. L'intensità colorimetrica in ogni singola banda è stata confrontata con quella derivata dalle bande di un controllo standardizzato, caricato in ogni gel, di cui conoscevamo la concentrazione. Tale strategia di colorazione è stata preferita all'utilizzo di proteine costitutive (e.g. Actina, GAPDH), poiché tali marcatori possono essere influenzati sia dall'invecchiamento che dall'AD stesso (Preece et al., 2003).

Analisi mediante western blotting

Le proteine estratte da tessuto cerebrale umano (10-15 µg), sono state separate in un gel denaturante di poliacrilammide al 12% e trasferite su un filtro di nitrocellulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Bio Rad, Hercules, CA). I siti aspecifici sulla membrana sono stati bloccati, lasciandola 12 h in una soluzione di TBS al 5% di latte (Bio-Rad) e 0.01% Tween 20. Le subunità del proteasoma sono state identificate utilizzando i seguenti anticorpi primari (Affiniti Research, UK): anti-HC3 (PW8105; 1:500), anti-β1 (PW8140; 1:5000), anti-LMP2 (PW8840; 1:2000) e anti-LMP7 (PW8845; 1:2000). I filtri sono stati incubati con gli anticorpi per 1h a temperatura ambiente in una soluzione al 5% di latte e 0.01% Tween 20 in TBS. Dopo alcuni lavaggi, sono stati aggiunti gli anticorpi secondari anti-topo, coniugati all'enzima perossidasi, e la reazione è stata quindi completata utilizzando il kit ECL (Santa-Cruz Biotechnology, CA). Abbiamo quindi condotto l'analisi densitometrica delle bande corrispondenti ad ogni subunità utilizzando il programma QuantityOne (Bio Rad) e i dati sono stati riportati come intensità per mm² (INT*mm²). Ogni esperimento è stato ripetuto diverse volte e abbiamo considerato la media risultante. Al fine di confrontare campioni caricati in gel differenti, i dati sono stati riportati come rapporto tra la densità di banda specifica dei campioni e del controllo standardizzato; il campione "CBL-AD 8" è stato utilizzato come controllo standardizzato in ogni gel. La quantità relativa di LMP2 (immunoproteasoma) e β1 (proteasoma costitutivo) sono stati riportati come rapporto LMP2/HC3 e β1/HC3, per ridurre al minimo gli errori di caricamento (le subunità α e β sono state identificate sui medesimi filtri di nitrocellulosa).

Per l'analisi delle proteine ottenute dai tessuti cerebrali di primati della specie *M.fascicularis* abbiamo seguito la stessa metodica ma utilizzato anche altri anticorpi. In particolare, il contenuto totale di proteasoma è stato rilevato attraverso l'utilizzo di un anticorpo anti- $\alpha 4$ (HC6, PW8120; 1:3000). La presenza dell'immunoproteasoma è stato identificato mediante l'anticorpo anti-LMP2 (1:500) ed il complesso regolatore PA28 mediante l'anticorpo anti-PA28 α (PW8185; 1:2000). Gli anticorpi anti- $\beta 1$ ed anti-LMP7 non si sono mostrati reattivi verso le proteine di tale modello animale e quindi non sono stati utilizzati per ulteriori indagini.

Livelli di proteine ossidate

I livelli di proteine ossidate nelle diverse aree cerebrali dei primati non umani sono state identificate mediante l'utilizzo dell' OxyblotTM Protein Oxidation Detection Kit (Chemicon International, Temecula, CA). Brevemente, i gruppi carbonilici, introdotti nelle proteine in presenza di specie reattive dell'ossigeno, vengono derivatizzati a 2,4 dinitrofenilidrazone (DNP) per reazione con la 2,4 dinitrofenilidrazina. 15 μ g di proteine così modificate sono state separate in un gel di poliacrilammide denaturante al 12% e trattate secondo la metodica del western blotting sopra descritta. La presenza dei gruppi carbonilici modificati è stata rilevata attraverso l'utilizzo di un anticorpo primario anti-DNP (1:300, tutta la notte a +4°C) e di uno secondario anti-coniglio coniugato all'enzima perossidasi (1:300, 1h a temperatura ambiente). Con questo tipo di tecnica il segnale che si ottiene per ogni campione è dato da una serie di bande a diverso peso molecolare (più grandi sono le proteine, maggiore sarà la probabilità che qualche amminoacido sia ossidato); per questo motivo abbiamo quantificato il segnale corrispondente a tutto il campione separatosi nell'intera porzione di gel utilizzando il programma QuantityOne (Bio Rad) e i dati sono stati riportati come intensità per mm^2 ($\text{INT} \cdot \text{mm}^2$). Ogni esperimento è stato ripetuto e abbiamo considerato la media risultante. Anche in questo caso, al fine di confrontare campioni caricati in gel differenti, i dati sono stati riportati come rapporto tra ciascun campione e di un controllo standardizzato.

Attività dei proteasomi

Le tre attività dei proteasomi (chimotriptica, caspatica e triptica) sono state misurate negli estratti cerebrali umani utilizzando substrati fluorogenici specifici: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Bachem, Svizzera), Suc-Pro-Phe-Arg-MCA (Alexis, Austria), Suc-Leu-Leu-Glu-MCA (Bachem). 20 µg di estratti proteici e i substrati fluorogenici (concentrazione finale di 200nmol/ml) sono stati incubati insieme per 1 h a 37°C in un buffer contenente 50mM TRIS-HCl (pH=7.8), 20mM KCl, 5mM MgAc, e 0,5mM DTT. La fluorescenza di ogni reazione è stata misurata tramite un fluorimetro con emissione a 440 nm ed eccitazione a 380 nm.

L'attività dei proteasomi negli estratti cerebrali dei primati è stata misurata utilizzando i seguenti substrati fluorogenici: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Peptide Institute, J) per l'attività chimotriptica, Suc-Leu-Arg-Arg-MCA (Peptide Institute) per quella triptica e Boc-Leu-Leu-Glu-MCA (Affiniti Research, UK) per quella caspatica. 40 µg di estratti proteici e i substrati fluorogenici (concentrazione finale 50 µM) sono stati incubati insieme per 1 h a 37°C in un buffer contenente HEPES 50mM (pH=7.8), MgAc 2mM, e DTT 1mM, in una piastra da 96 pozzetti. La fluorescenza di ogni reazione è stata misurata tramite fluorimetro (SynergyTM HT, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont; software KC-4) con eccitazione a 360 nm ed emissione a 460 nm.

Dato che i proteasomi non sono le uniche proteasi che sono in grado di degradare i sopraccitati substrati, abbiamo usato un inibitore selettivo del proteasoma, la lactacistina, (concentrazione finale di 20 nmol/ml) per verificare quanto del segnale misurato dipendeva da questi complessi multicatalitici. Nelle nostre condizioni l' 85% dell'attività misurata dipendeva direttamente dal proteasoma.

Immunoistochimica.

La marcatura con anticorpi specifici è stata realizzata su sezioni di 2 µm, tagliate serialmente da pezzi selezionati di ippocampi e cervelletti provenienti da soggetti anziani non affetti da demenza e da pazienti colpiti da AD. Per i controlli giovani non dementi abbiamo analizzato la sostanza grigia e la materia bianca del lobo parietale. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anticorpo monoclonali specifici per la subunità β1i (Affiniti Research, clone LMP2-13,

diluito 1:300), Ab murino monoclonale specifico per la subunità $\beta 5i$ (Affiniti Research, clone LMP7-1, diluito 1:300), Ab murino monoclonale specifico per la subunità $\beta 1$ (Affiniti Research, diluito 1:300) del proteasoma 20S umano. Le sezioni sono state deparaffinate, reidratate, lasciate per 40' a 98°C con un buffer MS smascherante 10x e raffreddato a temperatura ambiente. La perossidasi endogena è stata bloccata in H₂O con 1% H₂O₂. Tutti gli anticorpi sono stati applicati a temperatura ambiente per 1h. Successivamente abbiamo proseguito la reazione con Ab caprino anti-polivalente e perossidasi-streptavidina (LabVision Corporation, Fremont, CA, USA). Per misurare l'attività perossidasi è stato usato il kit cromogenico DAKO (Dako, Carpintera, CA, USA). Le sezioni sono state contro colorate con l'Ematossilina di Mayer.

Omogeneizzazione dei tessuti ed estrazione di RNA totale.

200 mg di tessuto congelato (conservato a -80°C), da aree differenti dei campioni cerebrali umani e di primati della specie *M.fascicularis*, sono stati ridotti in polvere in un recipiente, ove abbiamo aggiunto continuamente azoto liquido e pestato con un mortaio. Abbiamo quindi aggiunto 2 ml del reagente TRIZOL (Life Technologies, Paisley, UK) per mantenere l'integrità dell'RNA, e per distruggere le componenti cellulari. Abbiamo separato la soluzione in una fase acquosa contenente RNA e un'organica contenente DNA e proteine mediante l'aggiunta di cloroformio, seguita da centrifugazione. La successiva aggiunta di isopropanolo (10' di incubazione a 4°C seguiti da centrifuga a 12000g per 10' a 4°C) ha consentito di recuperare la fase acquosa (Chomezynski et al., 1987). Dopo precipitazione, il pellet contenente l'RNA è stato lavato, asciugato, risospeso in acqua priva di RNAasi e quantificato allo spettrofotometro ($\lambda=260$ nm). Abbiamo verificato la qualità dell'RNA misurando il rapporto dell'OD 260/280 nm e la sua integrità in un gel agarosio MOPS-Formaldeide.

RT-PCR

Il primo filamento di cDNA è stato ottenuto da RNA totale utilizzando il sistema SuperscriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsband, CA), una versione ingegnerizzata della retrotrascrittasi M-MLV con ridotta attività RNasica H e maggiore stabilità termica. A 5 μ g di RNA totale sono stati

aggiunti 1.5 µg di Random Primers, 10 nmoli di ciascun dNTP e acqua per un volume finale di 13 µl. Questa miscela di reagenti è stata riscaldata a 65°C per 5', portata poi a 25°C e sono stati aggiunti i restanti reagenti: 4µl di First-Strand Buffer 5X (250mM Tris-HCL, pH=8.3; 375 mM KCL, 15 mM MgCl₂), 1 µl di DTT 0.1M e 200U di enzima. La reazione di retrotrascrizione è stata condotta secondo i seguenti passaggi: 25°C per 5', 50°C per 50', 70°C per 15'.

Il cDNA così ottenuto è stato sottoposto a reazione di PCR, utilizzando primers specifici (TIB MOLBIOL, I) per il messaggero di LMP2 (NM_002800) che amplificano l'intera sequenza codificante:

Fw1: 5'-GAG AGC GGT GCC TTG CAG G-3'

Rw1: 5'-GGG GAA GGT TCA CTC ATC ATA G-3'

La reazione di PCR ha previsto l'impiego dei seguenti reagenti: 5 µl di Buffer 10X, 2 µl di MgCl₂ 50mM, 5 µl di dNTPs 2.5mM ciascuno, 25 pmoli di ciascun primers, 5 µl di cDNA, 1.25 U di enzima *Taq* DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen) e acqua per un volume finale di 50 µl. La miscela è stata sottoposta 30 cicli di amplificazione così ripartiti: 94°C per 5', 94°C per 1', 59°C per 50'', 72°C per 1', 72°C per 5'.

Da tale reazione, secondo quanto riportato in letteratura (Singal et al., 1995), si ottengono due frammenti, rispettivamente di 688 pb e 657 pb, che differiscono di 30 pb nella regione che codifica per la pro-sequenza della proteina. La presenza del prodotto di PCR è stato visualizzato su gel di agarosio.

Reazione di sequenziamento

Poiché dalla reazione di PCR abbiamo ottenuto solo la variante più lunga della sequenza codificante per LMP2, abbiamo proceduto direttamente alla reazione di sequenziamento.

Il prodotto di amplificazione è stato dapprima purificato utilizzando il sistema ExoSAP-IT[®] (USB Corporation, Cleveland, Ohio), che contiene l'Esonucleasi I, deputata alla degradazione di primers e filamenti singoli di DNA, e la Shirimp Fosfatasi Alcalina, che elimina i dNTPs inutilizzati. A 10 µl di amplificato si aggiungono 2 µl della miscela di enzimi e si segue il seguente profilo termico: 37°C per 30', 80°C per 15'.

Per la reazione di sequenziamento abbiamo utilizzato il BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, CA) ed è stata condotta in un volume finale di 10 µl utilizzando: BDT v3.1 RR mix, primers forward o reverse (3.2 pmol/µl), buffer di sequenziamento 5X e 2 µl di prodotto di PCR purificato. La miscela è stata sottoposta ai seguenti cicli di sequenziamento: 96°C per 1', 96°C per 10', 50°C per 5'', 60°C per 4' (per 25 cicli). Come primers, sono stati utilizzati quelli che hanno originato il prodotto di amplificazione e due interni allo stesso, la cui sequenza è:

Fw2: 5'-CGA GGC GGT GGT GAA CCG-3'

Rw2: 5'-TCT CAC CAC ATT TGC AGC AGC C-3'

Pulizia della reazione di sequenziamento

Una volta terminata la reazione di sequenziamento, si procede alla pulizia direttamente in piastra aggiungendo a ciascun campione 2.5 µl di EDTA 125 mM, 2.5 µl di sodio acetato pH 4.6, 25 µl di etanolo assoluto. Si lascia a -20°C per 30' e si centrifuga a 1600g per 45' a 4°C; si decanta, si aggiungono 30 µl di etanolo al 70% e si centrifuga a 1600g per 15'. Si decanta come sopra e si procede ad un'ulteriore spinnata a 100g per 1'. I pozzetti vengono fatti essiccare a 37°C, al buio, per 20' e in seguito si risospescono le sequenze in una soluzione denaturante di formammide (10 µl per pozzetto). La miscela ottenuta viene infine sottoposta a denaturazione termica, a 95°C per 2'. L'analisi della composizione nucleotidica è stata effettuata utilizzando il sequenziatore automatico ABI Prism 3730 (Applied Biosystem).

Analisi bioinformatica della reazione di sequenziamento ed elaborazione di un modello strutturale *in silico* del core 20S

Le sequenze del messaggero di LMP2 dei primati non umani ottenute sono state analizzate utilizzando il programma Chromas V 2.1 ed allineate con quella umana utilizzando il programma GCG, il cui utilizzo è concesso a diversi dipartimenti dell'Università di Bologna. Lo stesso software è stato utilizzato per la traduzione della sequenza nucleotidica in proteina e la comparazione con quella umana.

L'elaborazione del modello strutturale *in silico* dell'immunosubunità LMP2 di primati e la sua collocazione all'interno del *core* 20S umano del proteasoma è stata condotta dal Dr. Richard Sessions, afferente all'Università di Bristol (UK), basandosi sul modello precedentemente prodotto (Mishto et al., 2006), utilizzando il programma Insight II (Accelrys, Cambridge, UK).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati ottenuti dal western blotting e dai saggi di attività è stata condotta utilizzando il test-U di Mann-Whitney, implementato nel programma SPSS.

4. RISULTATI

4.1 L'immunoproteasoma è espresso nel sistema nervoso centrale di soggetti anziani non colpiti da demenza e in pazienti affetti da AD.

Al fine di studiare il ruolo dell'immunoproteasoma nell'invecchiamento cerebrale e nella principale malattia neurodegenerativa età-associata, l'AD, abbiamo inizialmente verificato la presenza dell'immunoproteasoma nel cervello, mediante la rilevazione, tramite Western blotting, di LMP2 e LMP7, due subunità catalitiche, specifiche per tale isoforma del proteasoma, in 10 ippocampi di donatori anziani non affetti da demenza (K), 10 ippocampi di soggetti colpiti da AD (regioni affette dalla patologia, HPG-AD) e 10 cervelletti (regioni non affette dalla patologia, CBL-AD) dei medesimi pazienti. La rivelazione immunochimica di LMP2 e LMP7 (**Fig. 6A**) negli estratti proteici ha indicato la presenza dell'immunoproteasoma sia negli anziani non dementi (K) che nei pazienti affetti da AD, in entrambe le aree analizzate (HPG-AD e CBL-AD).

La presenza dell'immunoproteasoma è stata inoltre confermata dall'amplificazione dell'mRNA di LMP2 mediante RT-PCR, sugli RNA estratti da K, HPG-AD e CBL-AD (**Fig. 6B**).

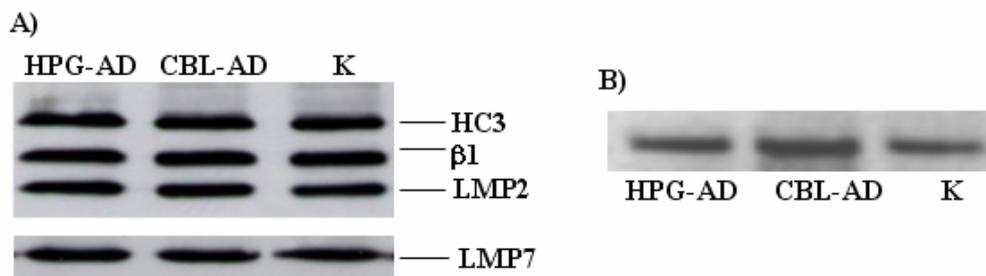


Figura 6. L'immunoproteasoma ed il proteasoma costitutivo sono espressi nel cervello umano. (A) Analisi mediate Western blotting degli estratti totali di HPG-AD, CBL-AD e K, utilizzando anticorpi (Ab) specifici per la subunità α (HC3), per quella catalitica β 1 specifica per il proteasoma costitutivo, e per LMP2 ed LMP7, rappresentative dell'immunoproteasoma. (B) Analisi elettroforetica del prodotto di RT-PCR per l'immunosubunità LMP2 in HPG-AD, CBL-AD e K.

4.2 L'espressione cerebrale dei proteasomi e dell'immunoproteasoma è influenzata dall'invecchiamento.

Dato che il tessuto cerebrale era considerato fino a pochi anni fa, un organo immunologicamente privilegiato, e quindi privo anche di immunoproteasoma, abbiamo verificato se il precedente risultato fosse dovuto all'età dei soggetti studiati, che avevano infatti un'età superiore ai 60 anni.

Abbiamo quindi confrontato l'espressione dell'immunoproteasoma e della controparte costitutiva negli ippocampi di donatori giovani (età media 42 anni) e anziani (età media 70.2 anni). Specificatamente, gli estratti proteici totali, derivati dalla regione ippocampale, sono stati analizzati tramite Western blotting, verificando l'espressione delle subunità LMP2, LMP7, β 1 e HC3 dei proteasomi. Tali esperimenti hanno mostrato come due subunità dell'immunoproteasoma, LMP2 e LMP7, fossero presenti nei campioni degli anziani (K), ma solo in maniera minima in quelli dei giovani; in particolare solo 1 dei 6 campioni provenienti da soggetti giovani è risultato essere debolmente positivo alla marcatura con Ab anti-LMP2, mentre gli altri 5 sono risultati negativi (**Fig. 7A**). Inoltre, la marcatura con l'Ab anti-LMP7 ha dato un debole segnale nei soggetti Y, ma soltanto quando abbiamo caricato sul gel 30 μ g di proteine totali, invece degli abituali 10 μ g.

Da tali esperimenti è dunque emerso come l'immunoproteasoma è fortemente sovraespresso nell'ippocampo dell'uomo durante il processo di invecchiamento. Inoltre, il confronto tra campioni di giovani e anziani ha evidenziato come la quantità complessiva dei proteasomi ippocampali (proteasoma costitutivo ed immunoproteasoma) sia influenzata dall'invecchiamento. Infatti, il segnale derivato dall'anticorpo specifico per la subunità α HC3, è aumentato del 54% (valore di Mann-Whitney=4; $p=0.006$) nei soggetti anziani (**Fig. 7B**), come confermato anche dalla ibridazione con Ab anti- β 1, subunità costitutiva, controparte di LMP2.

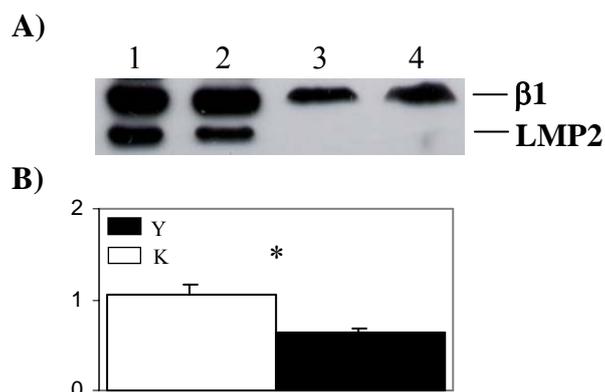


Figura 7. L'espressione dei proteasomi nell'ippocampo è influenzata dall'invecchiamento. (A) Rilevazione mediante Western blotting delle subunità $\beta 1$ e LMP2 nell'ippocampo di soggetti anziani (K) (pozzetti 1 e 2) e giovani (Y) (pozzetti 3 e 4). Entrambi i campioni Y sono negativi alla rilevazione con l'Ab anti-LMP2 e hanno una diminuzione nel segnale con l'Ab anti- $\beta 1$, rispetto a campioni K. (B) L'istogramma rappresenta la densità ottica ottenuta da 12 soggetti K e 5 soggetti Y, misurata sui filtri trattati con Ab specifico per la subunità α (HC3). Nei soggetti Y è emersa una diminuzione nella densità ottica della banda (HC3) del 35% ($p=0.006$). I valori sono riportati come media + SEM (errore standard medio) e la significatività statistica è stata calcolata con il test di Mann-Whitney.

4.3 L'immunoproteasoma è espresso in neuroni, astrociti ed endotelio.

Abbiamo successivamente focalizzato la nostra attenzione sul tipo o sui tipi cellulari che, nelle regioni cerebrali da noi analizzate, esprimessero l'immunoproteasoma. A tal fine abbiamo realizzato delle rilevazioni, mediante immunohistochimica, delle subunità $\beta 1$, LMP2 e LMP7 su campioni autoptici di ippocampo e cervelletto, provenienti da soggetti anziani non affetti da demenza e pazienti colpiti da AD, e sul lobo parietale di un soggetto giovane (età 42 anni), non affetto da demenza. Le strutture caratteristiche dell'ippocampo e del cervelletto sono identificabili, rispettivamente, in **Fig. 8A** e **8B**. Dagli esperimenti di immunohistochimica effettuati è emerso che LMP2 e LMP7 sono espressi dagli astrociti e, sorprendentemente, dagli stessi neuroni, mentre gli oligodendrociti sono risultati essere negativi ad entrambi gli anticorpi (**Fig. 8C**).

La marcatura con Ab anti- β 1, invece, ha confermato la diffusione ubiquitaria dei proteasomi costitutivi, poiché tutte le cellule sono risultate positive a tale anticorpo (**Fig. 8E**). Per quanto riguarda la differente espressione dell'immunoproteasoma e della sua controparte costitutiva, è interessante sottolineare come le cellule cerebellari di Purkinje, neuroni di grandi dimensioni su cui convergono tutti i segnali che giungono dalla corteccia cerebrale e dalle quali prendono origine quelli indirizzati ai nuclei profondi, siano solo debolmente reattive all'Ab anti-LMP2 (**Fig. 8D**), mentre hanno una netta positività per la subunità β 1 (**Fig. 8F**). Abbiamo anche osservato come le cellule endoteliali dei vasi sanguigni sono positive agli Ab specifici sia per l'immunoproteasoma che per quello costitutivo (**Fig. 8C ed E**).

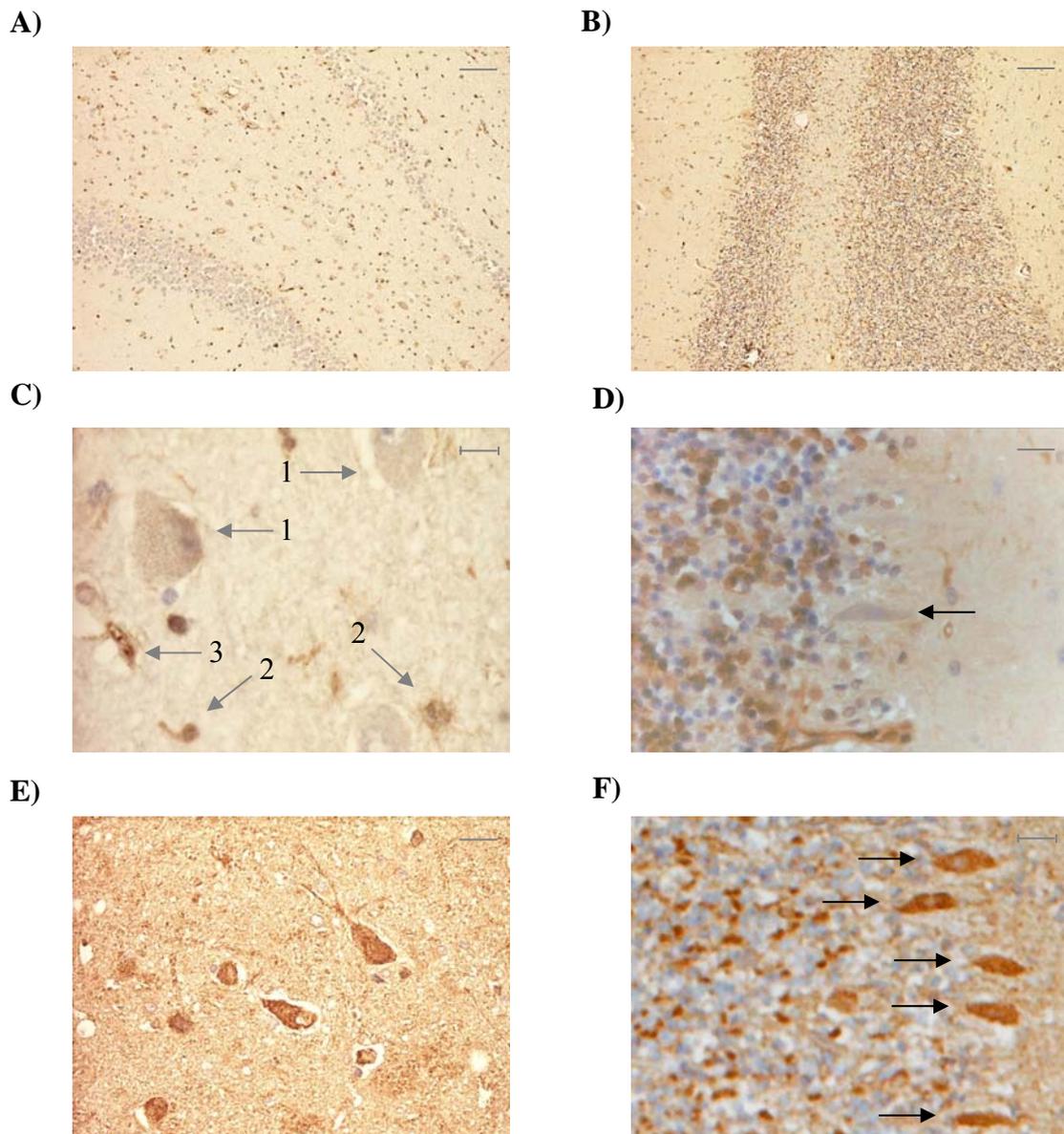


Figura 8. L'immunoproteasoma è espresso principalmente negli astrociti, nei neuroni e nell'endotelio vasale del SNC dei pazienti AD e nei soggetti anziani non affetti da demenza. La colorazione tramite immunoistochimica di LMP2 nell'ippocampo (A) e nel cervelletto (B) dei pazienti affetti da AD ha rivelato come gli astrociti, l'endotelio e le cellule neuronali esprimono, al contrario degli oligodendrociti, l'immunoproteasoma. (C) Immagine ad elevato ingrandimento di una sezione di ippocampo AD marcato con Ab anti-LMP2. Esempi di neuroni sono marcati con il numero 1, di astrociti con il 2 e dell'endotelio con il 3. (D) Particolare dei granuli cerebellari marcati con Ab anti-LMP2, in cui si distinguono le cellule di Purkinje (evidenziate con una freccia), negative alla marcatura con Ab anti-LMP2 e, al contrario, fortemente positive all'Ab anti- β 1 (F). (E) Immagine di una sezione di ippocampo di un paziente affetto da AD marcato con Ab anti- β 1. Al contrario della marcatura con Ab anti-LMP2, tutte le cellule sono positive alla subunità β 1, come atteso, considerando l'espressione ubiquitaria del proteasoma costitutivo. In A e B la barra d'ingrandimento corrisponde a 150 μ m, in C a 15 μ m, in D e F a 40 μ m, in E a 30 μ m.

Per quanto riguarda l'espressione dell'immunoproteasoma nella materia grigia (**Fig. 9A**) e sostanza bianca (**Fig. 9B**) dei soggetti giovani, la marcatura del lobo parietale con l'anticorpo anti-LMP2 ha dato esito negativo in tutti i tipi cellulari, eccetto che per quelle endoteliali.

Tali risultati ottenuti hanno un'importanza rilevante e sottolineano come la presenza dell'immunoproteasoma nel SNC sia legata a condizioni particolari, quali lo stato pro-infiammatorio, che si riscontra sia nell'invecchiamento che nelle patologie neurodegenerative. Inoltre, la sua diversa espressione all'interno delle cellule neuronali di aree differenti indica una regolazione area-specifica.

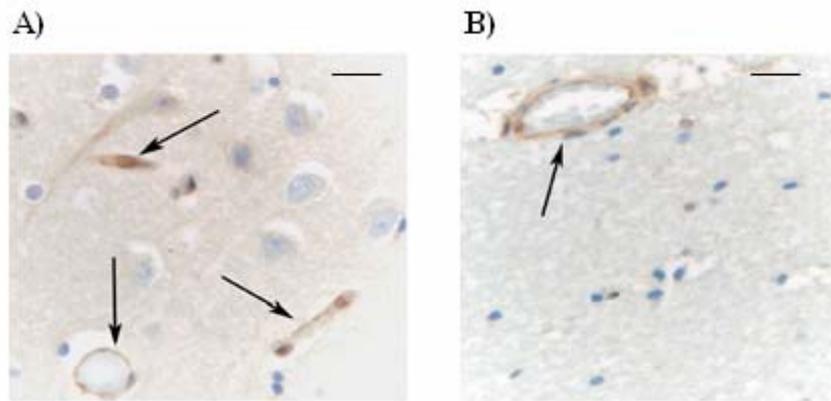


Figura 9. L'immunoproteasoma è espresso nelle cellule endoteliali del SNC di soggetti giovani non affetti da demenza. Colorazione tramite immunoistochimica di LMP2 nella corteccia (A) e sostanza bianca (B) del lobo parietale di un soggetto giovane non affetto da demenza. Solo le cellule endoteliali (freccie) risultano essere positive alla marcatura. La linea di ingrandimento corrisponde a 30 μm .

4.4 L'immunoproteasoma è espresso maggiormente nelle regioni affette dei pazienti AD.

Al fine di investigare quanto il fenotipo patologico tipico della malattia di Alzheimer influenzi la composizione del proteasoma, abbiamo comparato i livelli di immunoproteasoma e del proteasoma costitutivo nei campioni HPG-AD, CBL-AD e K. Inoltre, per la nostra analisi, abbiamo unito le aree CBL-AD e K nella casistica "Cnt"; ciò è stato possibile perché tali aree, pur avendo strutture e funzioni diverse, non presentano gli elementi biologici caratteristici dell'AD (i.e. PHF-tau e placche senili), che, come descritto in letteratura, hanno un'azione inibente sul sistema ubiquitina-proteasoma.

Abbiamo quindi valutato l'espressione di LMP2, $\beta 1$ e HC3 negli estratti proteici totali cerebrali avvalendoci della tecnica di Western blotting; i livelli relativi dell'immunoproteasoma e della sua controparte costitutiva sono stati riportati, rispettivamente, come rapporto tra la densità di segnale ottenuta dalla ibridazione con Ab anti-LMP2 e quella con Ab anti-HC3 (LMP2/HC3) e come rapporto tra la densità di segnale ottenuta dalla ibridazione con Ab anti- $\beta 1$ e

quella con Ab anti-HC3 (β 1/HC3). Infatti, assumendo che HC3, in quanto subunità α , sia rappresentativa di tutte le isoforme dei proteasomi, ci attendevamo che ad un aumento dei livelli di LMP2 (rappresentativo dell'immunoproteasoma) corrispondesse un corrispettiva diminuzione della subunità β 1 (rappresentativa dei proteasomi costitutivi). Tale assunto è stato sperimentalmente verificato e i dati ottenuti hanno messo in evidenza una conservazione dell'espressione di HC3 (**Fig. 6A**), e quindi della quantità di tutti i proteasomi, nelle casistiche analizzate (HPG-AD, CBL-AD, K).

Al contrario, abbiamo rilevato un significativo aumento nell'espressione di LMP2 nelle aree HPG-AD (**Fig. 10A**) rispetto a CBL-AD (valore di Mann-Whitney=11; $p=0.03$), K (valore di Mann-Whitney=16; $p=0.04$) e Cnt (valore di Mann-Whitney=27; $p=0.02$). Tale dato è stato confermato anche dalla tendenza inversa dell'espressione del proteasoma costitutivo, in quanto nei soggetti HPG-AD il livello relativo di β 1/HC3 risultava inferiore (**Fig. 10B**). Tale differenza, anche se non statisticamente significativa nel confronto HPG-AD vs K (valore di Mann-Whitney=12; $p=0.07$) e HPG-AD vs Cnt (valore di Mann-Whitney=25; $p=0.07$) è infatti in accordo con i risultati ottenuti con LMP2, e quindi conferma la correttezza del dato ottenuto, avendo osservato, come da ipotesi di partenza, una diminuzione dei livelli relativi del proteasoma costitutivo nei campioni che avevano un incremento dell'espressione dell'immunoproteasoma.

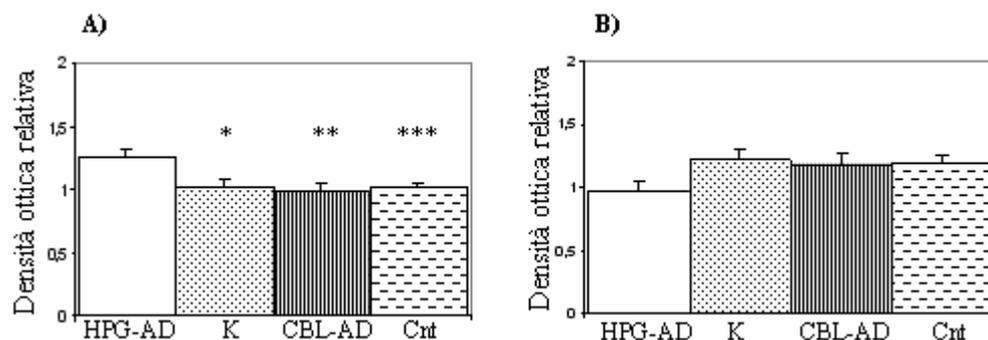


Figura 10. L'immunoproteasoma è differentemente espresso nelle aree cerebrali affette da AD. In questa figura sono riportati i valori di LMP2/ HC3 (A) e β 1/HC3 (B), ottenuti tramite immunoblotting con i rispettivi Ab specifici, realizzati su estratti totali di proteine, provenienti da campioni HPG-AD (ippocampo; n=7), K (ippocampo; n=11), CBL-AD (cervelletto; n=9) e Cnt (n=20). I valori sono riportati come media

delle densità ottiche relative + SEM. **(A)** L'espressione relativa di LMP2/HC3 è significativamente aumentata nell'ippocampo dei pazienti AD rispetto ai K (*, p=0.04), CBL-AD (**, p=0.03) and Cnt (***, p=0.02). **(B)** L'espressione relativa di β 1/HC3 ha mostrato una tendenza inversa rispetto a quella dell'immunoproteasoma con una significatività medio-bassa (HPG-AD vs K: p=0.07; HPG-AD vs Cnt: p=0.07). Tale dato conferma il risultato ottenuto osservando LMP2/HC3. La significatività statistica (*, **, ***) è stata calcolata con il test di Mann-Whitney.

4.5 L'immunoproteasoma e il complesso regolatore PA28 sono espressi nel sistema nervoso centrale di primati non umani.

La seconda parte del nostro studio è stata rivolta ad indagare il ruolo dell'immunoproteasoma e di uno dei suoi complessi regolatori, il PA28, nell'invecchiamento cerebrale di primati non umani della specie *Macaca Fascicularis*.

Come prima indagine abbiamo verificato se gli anticorpi specifici per le diverse subunità umane del proteasoma e dell'immunoproteasoma fossero reattive anche nei confronti delle proteine ottenute dal tessuto cerebrale di tali primati. Mediante Western blotting, è emerso che gli anticorpi monoclonali anti- α 4 e -LMP2 e policlonale anti-PA28 α (Affiniti Research; UK) riconoscono anche le proteine dei primati non umani, mentre lo stesso risultato non è stato ottenuto per quelli anti- β 1 ed -LMP7, per cui non abbiamo potuto utilizzarli per le indagini previste.

Abbiamo quindi investigato l'espressione del proteasoma costitutivo, dell'immunoproteasoma e del complesso regolatore PA28 nella corteccia frontale, temporale e cervelletto di primati non umani adulti (età media 10.1 anni; CxF, n=5; CxT, n=6; CBL, n=7) e anziani (età media 19.5 anni; CxF, n=3; CxT, n=6; CBL, n=6). La reazione immunochimica ha evidenziato che sia l'immunoproteasoma che il complesso regolatore PA28 sono espressi in CxF, nella CxT e nel CBL di animali anziani e adulti (**Fig. 11A, B e C**).

La presenza dell'immunoproteasoma nel SNC di primati non umani è stata confermata anche da RT-PCR per il messaggero di LMP2 (**Fig. 11D**).

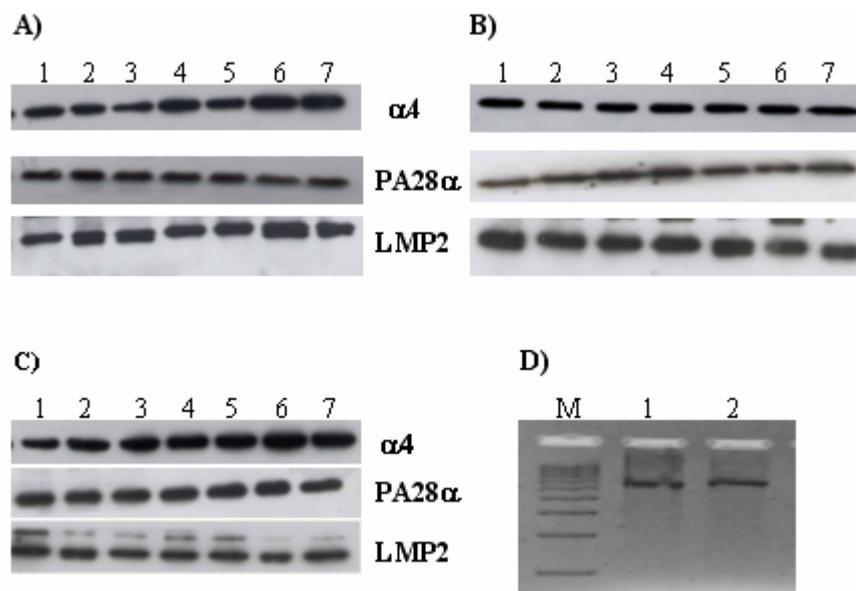


Figura 11. L'immunoproteasoma ed il complesso regolatore PA28 sono espressi nel cervello di primati non umani della specie *M.fascicularis*. La presenza del proteasoma, immunoproteasoma e PA28 è stata indagata mediante Western blotting in estratti proteici totali ottenuti dalla corteccia frontale (A), corteccia temporale (B), cervelletto (C) di animali adulti (pozzetti 1-3) ed anziani (pozzetti 4-7). Il contenuto totale di proteasoma è stato rilevato mediante l'anticorpo anti- $\alpha 4$, l'immunoproteasoma con l'anticorpo anti-LMP2 ed il complesso regolatore utilizzando l'anticorpo anti-PA28. La presenza dell'immunoproteasoma nel sistema nervoso di primati non umani è stata identificata anche mediante analisi elettroforetica del prodotto di RT-PCR per l'mRNA di LMP2 (D). M indica il marcatore di peso molecolare, il pozzetto 1 corrisponde ad un animale adulto, quello 2 ad uno vecchio.

4.6 Sequenza del messaggero e della proteina LMP2 nei primati non umani.

Poche informazioni sono disponibili riguardo la sequenza dei geni che codificano per le diverse subunità del proteasoma nei primati non umani della specie *Macaca Fascicularis*. Abbiamo quindi rivolto la nostra attenzione allo studio della sequenza dell' RNA messaggero e della proteina LMP2, dato il suo ruolo centrale nel regolare l'attività dell' immunoproteasoma. Da omogenati cerebrali di diversi primati non umani abbiamo estratto l'RNA totale e lo abbiamo sottoposto ad RT-PCR, utilizzando primers specifici che coprissero

l'intera sequenza codificante dell'mRNA di LMP2. Questa indagine da un lato ci ha confermato la presenza dell'immunoproteasoma nel SNC di primati non umani, anche se è stata riscontrata solo una delle due varianti di LMP2 descritte in letteratura, come spiegato nella sezione Materiali e Metodi (pag. 35).

Il prodotto di RT-PCR è stato sottoposto a reazione di sequenziamento, utilizzando quattro diversi primers in modo da coprire l'intero frammento, e le sequenze così ottenute sono state allineate con quella umana, avvalendoci del programma GCG. Da questa indagine è emerso che alcune posizioni della sequenza di LMP2 di *M.fascicularis* differiscono da quella umana. In particolare, 21 posizioni su 660 nucleotidi risultano essere diverse rispetto all'uomo in tutti e tre gli animali sequenziati, un'altra posizione è stata riscontrata solo in un animale mentre due siti si sono dimostrati eterozigoti in un terzo animale (**Fig. 12A**).

Successivamente, avvalendoci dello stesso programma bioinformatico, abbiamo tradotto in proteina la sequenza del messaggero di LMP2 dei primati della specie *M.fascicularis*, l'abbiamo allineata con quella umana ed è emerso che solo alcune delle varianti nucleotidiche riscontrate portano ad una variazione dell'amminoacido codificato. In particolare, abbiamo individuato 6 amminoacidi che differiscono tra le due specie; si tratta delle posizioni M14V, E39Q, S87T, R106H, Y133F, I173V, dove la prima lettera fa riferimento alla proteina LMP2 umana (**Fig. 12B**). È importante sottolineare che non ci sono differenze nella composizione amminoacidica della prosequenza, costituita dai primi 20 amminoacidi, e nei residui coinvolti, insieme a Thr1, nella catalisi (K33, G128, S129, G130). La numerazione degli amminoacidi fa riferimento alla sequenza della proteina matura.

A)

```

1
LMP2_Human ggcgcgttggtg cgctgtccca gggtggaaac cagtgcacca ggcggcgagg
MF ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
50

LMP2_Human ggcgcgttggtg cgctgtccca gggtggaaac cagtgcacca ggcggcgagg
MF ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
50

51
LMP2_Human agagcgggtgc cttgcagggg tgetgegggc gggagcacca accggggact
MF ~~~~~ ~~~~~~A TGCTGCGGGC AGGAGCACCA ACCGGGGACT
100

101
LMP2_Human taccctggggc gggagaagtc cacaccggga ccaccatcat ggcagtgagg
an5 TACCCCGGGC AGGAGAAAGTC CACACCGGGA CCACCATCAT GGCAGTGGAG
150

151
LMP2_Human tttgacgggg gcggttgat gggttctgat tcccagagtgt ctgcaggcga
MF TTTGACGGGG GCGTTGTGGT GGGTTCTGAT TCCCAGTGT CTGCAGGCGA
200

201
LMP2_Human ggcgggtgggtg aaccgagtggt ttgacaagct gtccccgctg cacgagcgca
MF GCGGGTGGTG AACCGAGTGT TTGACAAAGCT GTCCCCCTG CACCAGCGCA
250

251
LMP2_Human tctactgtgc actctctggt tcagctgctg atgccccaaac cgtggccgac
MF TCTACTGTGC ACTCTCCGGT TCAGCTGCCG ATGCCCCAAGC CGTGGCCGAC
300

301
LMP2_Human atggccgcct accagctgga gctccatggg atagaactgg aggaacctcc
MF ATGGCTGCCT ACCAGCTGGA GCTCCATGGG ATAGAAGTGG AGGAACCTCC
350

351
LMP2_Human acttgttttg gctgctgcaa atgtggtgag aaatatcagc tataaatatc
MF ACTTGTTCTG GCTGCTGCAA ATGTGGTGAG AAATATCAC C TACAAATATC
400

401
LMP2_Human gagaggactt gtctgcacat ctcatggtag ctggctggga ccaacgtgaa
MF GAGAGGACTT GTCTGCACAT CTCATGGTAG CTGGCTGGGA CCAACATGAA
450

451
LMP2_Human ggaggtcagg tatatggaac cctgggagga atgctgactc gacagccttt
MF GGGGGTCAGG TATATGGAAC CCTGGGAGGA ATGCTGACTC GACAACTTT
500

501
LMP2_Human tgccattggt ggctccggca gcacctttat ctatggttat gtggatgcag
MF TGCAATCGGT GGCTCCGGCA GCACCTATAT CTATGGTTAT GTGGATGCAG
550

551
LMP2_Human catataagcc aggcattgtct cccgaggagt gcaggcgctt caccacagac
MF CATATAAGCC AGGCATGTCT CCAGAGGAGT GCAGGCGCTT CACCACAGAC
600

601
LMP2_Human gctattgctc tggccatgag ccgggatggc tcaagcgggg gtgtcatcta
MF GCTATTGCTC TGGCCATGAG CCGGGACGGC TCAAAGCGGGG GTGTCTCTA
650

```

```

651                                     700
LMP2_Human cctgggtcact attacagctg cgggtgtgga ccategagtc atcttgggca
MF CCTGGTCACT ATTACAGCTG CTGGTGTGGA CCATCGAGTC ATCTTGGGCA

```

```

701
LMP2_Human atgaactgcc aaaattctat gatgagtga
MF ATGAGCTGCC AAAATTCTAT GATGAGTGA

```

B)

```

1                                     50
MF MLRAGAPTGD LPRAGEVHTG TTIMAVEFDG GVVVGSDSRV SAGEAVVNRV
LMP2_Human MLRAGAPTGD LPRAGEVHTG TTIMAVEFDG GVVMGSDSRV SAGEAVVNRV

51                                     100
MF FDKLSPLQR IYCALSGSAA DAQAVADMAA YQLELHGIEL EEPPLVLAAA
LMP2_Human FDKLSPLER IYCALSGSAA DAQAVADMAA YQLELHGIEL EEPPLVLAAA

101                                    150
MF NVVRNITYKY REDLSAHLMV AGWDQHEGGQ VYGLGGMLT RQPFAIGGSG
LMP2_Human NVVRNISYKY REDLSAHLMV AGWDQREGGQ VYGLGGMLT RQPFAIGGSG

151                                    200
MF STYIYGYVDA AYKPGMSPEE CRRFTTDAIA LAMSRDGSSG GVVYLVTTITA
LMP2_Human STFIYGYVDA AYKPGMSPEE CRRFTTDAIA LAMSRDGSSG GVIYLVTTITA

201                                    219
MF AGVDHRVILG NELPKFYDE
LMP2_Human AGVDHRVILG NELPKFYDE

```

Figura 12. Allineamento della sequenza nucleotidica codificante e della proteina LMP2 di *Homo Sapiens* e *Macaca Fascicularis* (Mf). (A) La sequenza nucleotidica codificante per LMP2 dei primati non umani, ottenuta tramite RT-PCR e successivo sequenziamento, è stata allineata con quella umana. Le divergenze tra le due specie sono sottolineate. In (B) è riportato l'allineamento proteico. I primi 20 amminoacidi rappresentano la prosequenza e sono rimossi per autocatalisi durante la maturazione del proteasoma. Le divergenze amminoacidiche tra le due specie sono evidenziate in grassetto.

4.7 Elaborazione di un modello strutturale *in silico* dell'immunoproteasoma 20S umano contenente la sequenza di LMP2 di primati non umani.

Dopo aver ottenuto la sequenza della proteina LMP2 dei primati della specie *M.fascicularis* abbiamo deciso di studiare il possibile effetto dei sei diversi amminoacidi sulla struttura della proteina stessa e sull'organizzazione del core 20S. Grazie alla preziosa collaborazione con il Dr. Richard Sessions, abbiamo elaborato un modello strutturale *in silico* dell'immunoproteasoma 20S umano, contenente la proteina LMP2 dei primati della specie *M.fascicularis* (**Fig. 13B**). Tale modello si è basato su uno precedentemente prodotto, nell'ambito di uno studio parallelo portato avanti negli ultimi anni dal nostro laboratorio, al fine di indagare l'effetto di un polimorfismo di LMP2 (R60H) sulla struttura e attività del complesso multicatalitico (Mishto et al., 2006) (**Fig. 13A**). Da questo studio è emerso che quattro sostituzioni amminoacidiche riscontrate in LMP2 di primati della specie *M.fascicularis*, specificamente M14V, S87T, F133Y e I173V (**Fig. 13C**), paiono essere conservative all'interno del *core* 20S e quindi non dovrebbero modificarne la funzione. Invece le sostituzioni E39Q e R106H influenzano la carica totale della subunità LMP2 e potrebbero quindi indebolire le interazioni elettrostatiche rispettivamente con i residui K226 e D144 delle subunità $\alpha 1$ ed $\alpha 7$ (**Fig. 13D**). Ciò modificherebbe negativamente le forze che tengono insieme le subunità α e β e, poiché le posizioni 39 e 106 si trovano in prossimità del canale interno dell'immunoproteasoma, potrebbero rendere più aperto ed accessibile tale passaggio ai polipeptidi che fuoriescono dal camera proteolitica.

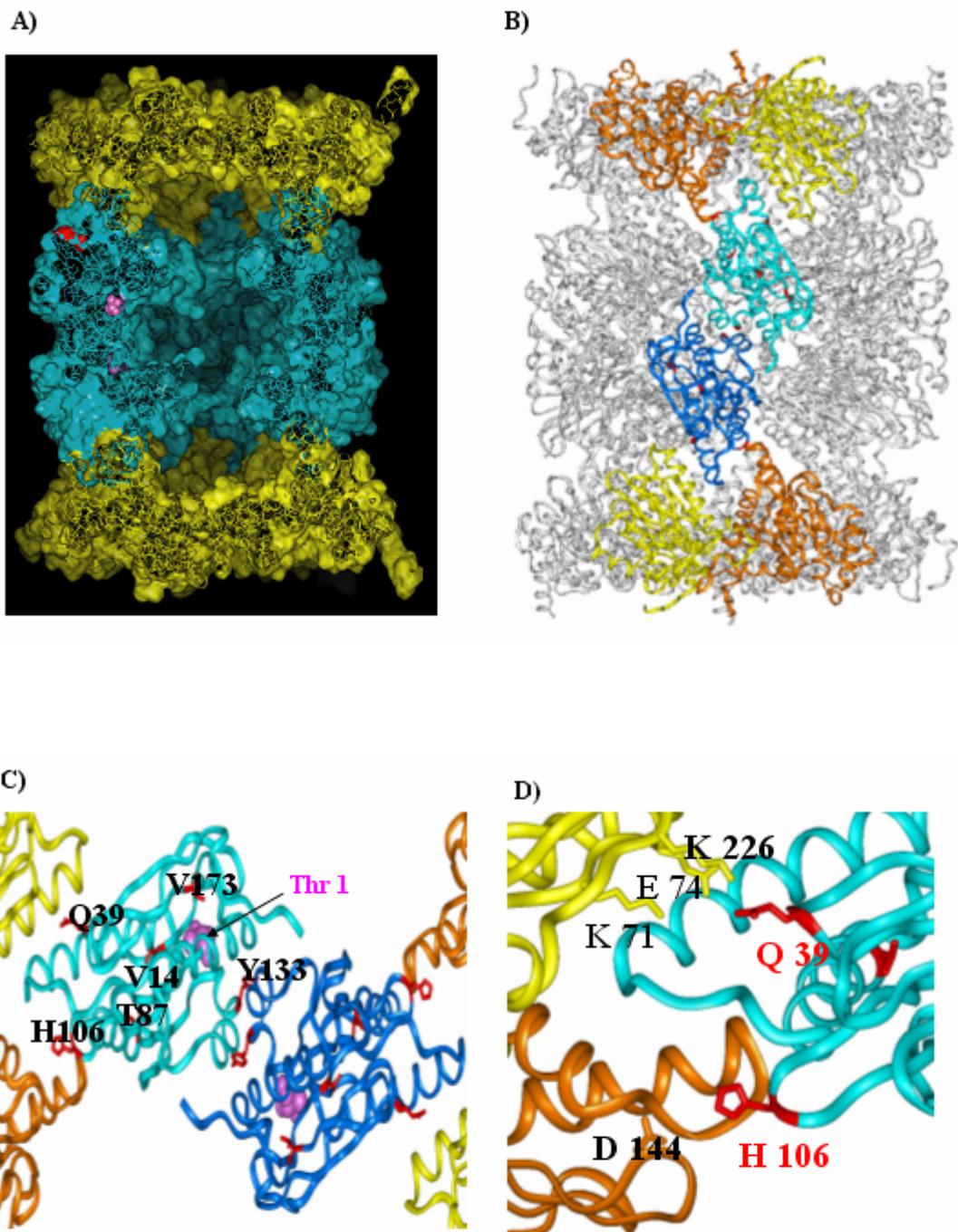


Figura 13. Modello strutturale *in silico* del core 20S. In (A) è rappresentato il modello strutturale *in silico* dell'immunoproteasoma 20S umano. In giallo sono rappresentati gli anelli α , in blu quelli β , in rosso la Thr 1 ed in rosa il codone 60 (Mishto et al., 2006). In (B) è rappresentato il core 20S umano contenente la proteina LMP2 di primati della specie *M.fascicularis* (in azzurro e blu). In giallo sono evidenziate le subunità $\alpha 1$, in arancione quelle $\alpha 7$. In (C) sono mostrati i residui di LMP2 di *M.fascicularis* diversi da quella dell'uomo. In (D) sono rappresentate le interazioni di Q39 e H106 di LMP2 con K226 di $\alpha 1$ e D144 di $\alpha 7$.

4.8 I livelli di espressione delle subunità del proteasoma, immunoproteasoma e PA28 non sono età-dipendenti.

Poiché la presenza dell'immunoproteasoma nel SNC di animali adulti è un dato in controtendenza, rispetto a quanto riportato precedentemente per l'uomo, abbiamo indagato se ci fossero differenze età-correlate nei livelli di espressione, oltre che dell'immunoproteasoma, anche del proteasoma e del PA28, nelle tre aree considerate degli animali adulti e anziani. Dal nostro studio è emerso che non ci sono variazioni legate all'invecchiamento nei livelli di immunoproteasoma, misurati attraverso l'anticorpo specifico per LMP2 (**Fig. 14A**), ed del complesso regolatore PA28, identificato dall'anticorpo anti-PA28 α (**Fig. 14B**), in CxF, CxT e CBL. Per quanto riguarda i livelli di proteasoma totale, il segnale derivato dall'anticorpo anti- α 4 non ha mostrato differenze età-correlate nelle aree CxT e CBL mentre è emerso un suo incremento al limite della significatività nella CxF di animali anziani rispetto a quelli adulti (valore di Mann Whitney $n=1$, $p=0.053$) (**Fig. 14C**).

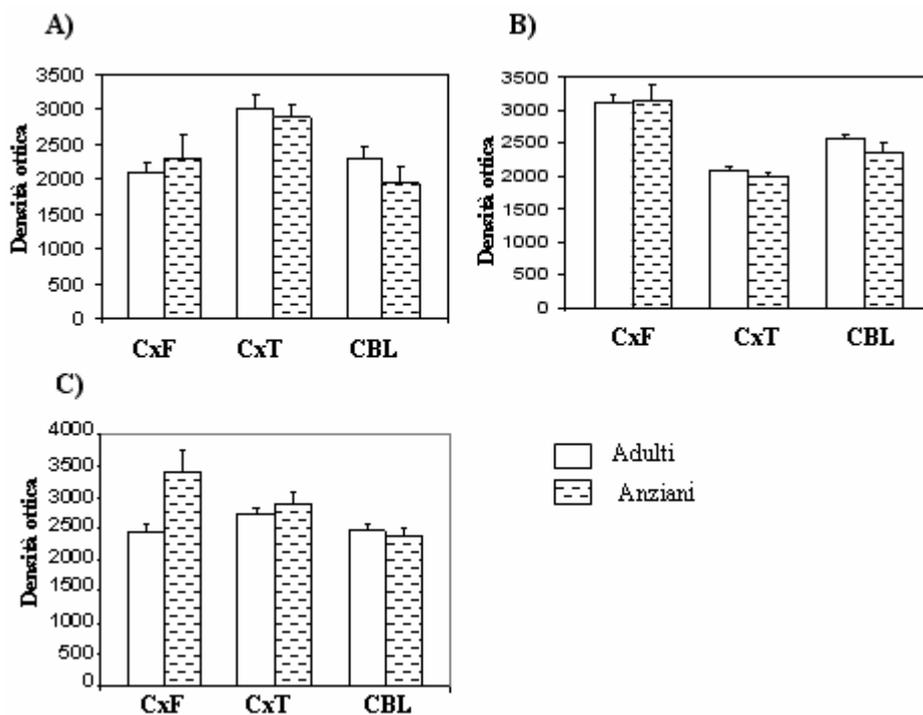
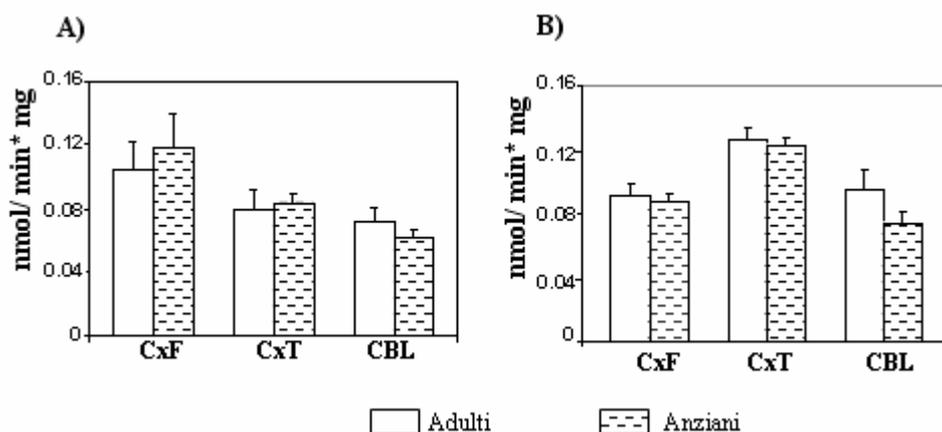


Figura 14. I livelli di espressione del proteasoma, immunoproteasoma e complesso regolatore PA28 non si modificano con l'invecchiamento nel tessuto cerebrale di

primati non umani. Gli estratti proteici totali ottenuti da animali adulti (CxF n=5; CxT n=6; CBL n=7) e anziani (CxF n=3; CxT n=6; CBL n=6) sono stati analizzati mediante Western blotting. Il segnale ($\text{Vol INT} \cdot \text{mm}^2$) ottenuto utilizzando gli anticorpi anti-LMP2 per l'immunoproteasoma (**A**), anti-PA28 α per il complesso PA28 (**B**) ed anti- $\alpha 4$ per il contenuto totale di proteasomi (**C**) è stato quantificato mediante il programma QuantityOne. I dati sono riportati come media delle densità ottiche relative + SEM. Utilizzando il test di Mann-Whitney non sono emerse differenze significative tra animali adulti ed anziani nei livelli di LMP2, PA28 α e $\alpha 4$ in CxT e CBL. Un aumento al limite della significatività è emerso per $\alpha 4$ in CxF di animali anziani rispetto a quelli adulti (valore di Mann-Whitney =1, $p=0.053$).

4.9 L'attività dei proteasomi non si modifica durante l'invecchiamento.

Oltre ad indagare i livelli dei proteasomi e del complesso regolatore PA28 ci siamo interessati anche ad ottenere informazioni riguardo all'attività proteolitica, nelle diverse aree di primati non umani. Per questo abbiamo misurato l'attività chimotriptica, triptica e caspastica dei proteasomi 20S mediante la degradazione di substrati fluorogenici, rispettivamente Boc-LLVY-MCA, Boc-LRR-MCA e Z-LLE-MCA in animali adulti (CxF, n=5; CxT, n=6; CBL, n=7) e anziani (CxF, n=4; CxT, n=6; CBL, n=6). Da questa indagine è emerso che non ci sono differenze età-dipendenti nell'attività proteolitica dei proteasomi, in nessuna delle tre aree considerate (**Fig. 15**).



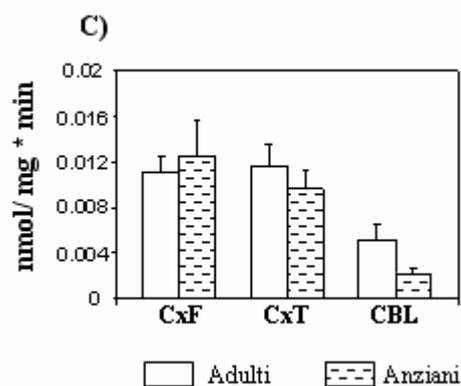


Figura 15. Attività dei proteasomi nel SNC di primati non umani. L'attività chimotriptica (A), triptica (B) e caspatica (C) è stata misurata mediante l'utilizzo di substrati fluorogenici in estratti proteici totali di CxF, CxT e CBL, di animali adulti e anziani. I valori indicati corrispondono alla media + SEM dell'attività specifica (nmol/mg*min).

4.10 I livelli di proteine ossidate aumentano nella corteccia frontale di animali anziani.

Poiché il proteasoma 20S, ed in particolare l'immunoproteasoma, è deputato all'eliminazione delle proteine ossidate e la produzione di tali specie aumenta durante l'invecchiamento, abbiamo misurato, attraverso western blotting, i livelli di questo particolare gruppo di proteine modificate nelle diverse aree cerebrali di primati adulti (CxF, n=4; CxT, n=6; CBL, n=7) e anziani (CxF, n=4; CxT, n=6; CBL, n=5). Da questa indagine abbiamo riscontrato che non ci sono sostanziali differenze nei livelli di proteine ossidate nella corteccia temporale (**Fig. 16A**) e cervelletto (**Fig. 16B**) di animali adulti ed anziani, mentre un significativo aumento è stato dimostrato nella corteccia frontale di primati anziani della specie *M.fascicularis* (valore di Mann Whitney=0, p=0.021) (**Fig. 16C ed E**). La colorazione del gel di poliacrilammide degli estratti proteici di CxF con Coomassie Blue ha mostrato l'isocaricamento dei campioni (**Fig. 16D**)

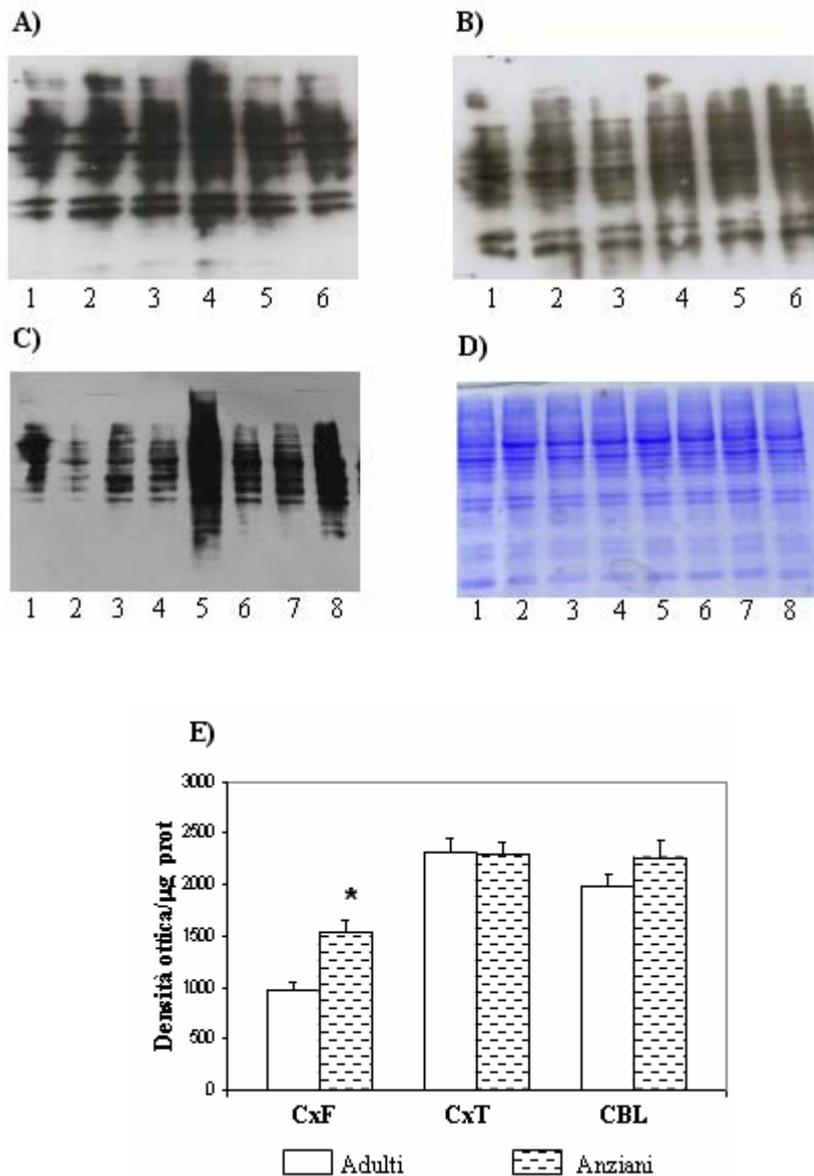


Figura 16. Livelli di proteine ossidate nel cervello di primati non umani. I livelli di proteine ossidate sono state analizzate mediante Western blotting in estratti proteici totali di CxT (**A**; pozzetti 1-3 adulti, 4-6 anziani), CBL (**B**; pozzetti 1-3 adulti, 4-6 anziani) e CxF (**C**; pozzetti 1-4 adulti, 5-8 anziani). In (**D**) è mostrato un gel di poliacrilammide colorato con Coomassie Blue di estratti proteici di CxF, a sottolineare l'isocaricamento dei campioni. In (**E**) il segnale corrispondente a ciascuna *lane* dei campioni di CxF, CxT e CBL è stato quantificato (Vol INT*mm²) ed è emerso un incremento significativo dei livelli di proteine ossidate in CxF di animali anziani rispetto ai giovani (valore di Mann-Whitney=0, p=0.021).

5. DISCUSSIONE

Nello studio scientifico presentato in questa tesi di dottorato abbiamo analizzato il ruolo del sistema ubiquitina-proteasoma nell'invecchiamento cerebrale umano, in condizioni fisiologiche ed accennando alla malattia di Alzheimer (AD), e in primati non umani della specie *Macaca Fascicularis*. Tali modelli animali sono molto utilizzati negli studi biomedici per la loro vicinanza filogenetica con l'uomo che li rendono più adatti di altri ad indagare il processo d'invecchiamento e gli eventi precoci che portano all'insorgenza di diverse patologie età-correlate, tra cui quelle neurodegenerative.

Per questo scopo abbiamo investigato l'espressione, localizzazione ed attività dell'immunoproteasoma nel tessuto cerebrale di soggetti anziani non affetti da demenza, controlli giovani, pazienti sofferenti di AD, e animali adulti e anziani della specie *M.fascicularis*. In questo modello abbiamo considerato anche il ruolo del complesso regolatore PA28 e caratterizzato l'immunosubunità LMP2, elaborando anche un modello strutturale *in silico* dell'immunoproteasoma 20S umano contenente la proteina LMP2 di primati *M.fascicularis*.

Benché storicamente il SNC sia sempre stato considerato un organo "immunologicamente privilegiato" e quindi anche privo di immunoproteasoma (Zanelli et al., 1993; Zhou et al., 1993; Neumann et al., 1995; Noda et al., 2000), abbiamo individuato tale complesso multicatalitico nel tessuto cerebrale sia di anziani non dementi che in quello proveniente da pazienti affetti da AD. Tale risultato è stato confermato anche dagli esperimenti di immunoistochimica che hanno evidenziato come l'immunoproteasoma sia espresso in diversi tipi cellulari quali neuroni, astrociti e cellule endoteliali. La colorazione immunoistochimica anti-LMP2 non ha mostrato particolari differenze tra gli ippocampi dei controlli anziani non dementi ed i pazienti AD. Tuttavia la diversa espressione dell' immunoproteasoma nei neuroni ippocampali ed in quelli cerebellari (cellule del Purkinje) fa supporre che la sua regolazione possa essere area-specifica.

L' individuazione dell'immunoproteasoma in neuroni e astrociti del cervello umano, in accordo con un recente studio (Diaz-Hernández et al., 2003) riguardante la patologia di Huntington, ha introdotto nuovi elementi a favore della teoria recente secondo la quale i neuroni non siano elementi passivi nel processo di neuroinfiammazione, ma, al contrario, partecipino insieme alle

cellule gliari alla risposta immunitaria nel SNC (Foster et al., 2002; McGeer et al., 2002). A questo riguardo, il lavoro presentato in questa tesi ha messo in luce un interessante risultato per lo studio degli effetti dell'invecchiamento sulla neuroinfiammazione cerebrale. Infatti, l'immunoproteasoma, che è chiaramente espresso nell'ippocampo di anziani non affetti da demenza, sembra non essere espresso, o solo in quantità minime, nell'ippocampo di soggetti giovani e limitatamente alle cellule endoteliali, come dimostrato dai dati di immunohistochimica. Questo quindi ci porta a sostenere che l'invecchiamento cerebrale umano sia caratterizzato da uno stato pro-infiammatorio cronico, come già proposto da altri (Lee et al., 2000), e che quindi il concetto generale di *inflamm-aging*, descritto dal nostro laboratorio per l'immunosenescenza (Franceschi et al., 2000a) si applichi anche al SNC. Diversi studi hanno evidenziato che l'invecchiamento cerebrale si accompagna anche ad alterazioni metaboliche soprattutto a carico dei mitocondri, causando un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno. Queste a loro volta sono in grado di danneggiare le macromolecole tra cui le proteine, favorendone l'ossidazione. Alti livelli di proteine ossidate che sono stati riscontrati nei cervelli invecchiati (Floyd et al., 2002), e studi *in vitro* hanno dimostrato che tali specie sono in grado di indurre l'espressione delle subunità LMP2, LMP7 e MECL-1, generando quindi l'immunoproteasoma (Ding et al., 2003).

Un altro elemento importante che emerge dal nostro studio è che l'invecchiamento cerebrale è caratterizzato, oltre che dalla presenza dell'immunoproteasoma, anche da un aumento del contenuto totale di proteasomi (immunoproteasoma + proteasoma costitutivo), almeno per quanto riguarda l'ippocampo. Questo risultato è in accordo con quanto rivisto da Gray et al. nel modello murino, che hanno evidenziato come nel cervello dei topi anziani vi sia un aumento nell'espressione di alcune delle subunità α e una diminuzione nell'espressione di $\beta 2$. Questo ultimo dato è stato indirettamente confermato dal nostro studio quando abbiamo preso in considerazione il ruolo dell'immunoproteasoma, oltre che nell'invecchiamento cerebrale fisiologico, anche in una delle principali malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer. Abbiamo infatti riscontrato un aumento nei livelli di LMP2, e quindi di immunoproteasoma, nell'ippocampo dei pazienti affetti da AD rispetto a quello

degli anziani non dementi, accompagnato da un'inversa tendenza per $\beta 1$ (proteasoma costitutivo). E' noto infatti che i principali marcatori istopatologici dell'AD, quali le placche senili (SP) e grovigli intracellulare della proteina Tau (PHFs-Tau) stimolano la neuroinfiammazione. In particolare la letteratura riporta che la proteina precursore della β amiloide (β APP) sia capace di indurre l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, direttamente coinvolto nell'espressione di LMP2 e LMP7 (Bales, 2000). L'attivazione di tale via di segnalazione può quindi spiegare l'osservato aumento dell'immunoproteasoma negli ippocampi dei pazienti AD rispetto agli anziani non dementi. Poiché tale forma di immunoproteasoma è più attiva rispetto al proteasoma costitutivo nel degradare alcune proteine, tra cui Tau (Cardozo et al., 2002), che ha un ruolo centrale nella patogenesi e progressione dell'AD, l'induzione di questa particolare forma di proteasoma potrebbe essere un tentativo che la cellula fa per mantenere la sopravvivenza cellulare. Quindi sia i dati in letteratura che quelli prodotti dal nostro laboratorio, indicano che la composizione e l'attività dei proteasomi nel SNC cambiano con l'età, probabilmente alterando la omeostasi neuronale, in cui il proteasoma gioca un ruolo fondamentale (Sullivan et al., 2004). Potremmo quindi ipotizzare che l'osservato aumento dei livelli di proteasomi negli ippocampi dei soggetti anziani potrebbe essere dovuto ad un progressivo danneggiamento età-associato del sistema Ubiquitina-Proteasoma (Keller et al., 2002), il cui mal funzionamento o inibizione porterebbe ad un incremento della sintesi *de novo* del proteasoma (Meiners et al., 2003) al fine di preservare i neuroni, cellule non replicanti, dalla morte.

La seconda parte del nostro studio ha avuto come scopo quello di indagare le modificazioni età-associate del sistema ubiquitina-proteasoma nel SNC in un modello animale che fosse il più vicino possibile all'uomo. Per questo scopo sono stati utilizzati primati non umani della specie *Macaca Fascicularis*, di cui nulla è noto riguardo tale via degradativa. Il nostro lavoro si è collocato all'interno di un progetto più ampio, che comprendeva diverse unità operative, dal titolo "Sviluppo e maturazione delle placche senili nel sistema nervoso di primati come modello per lo studio della malattia di Alzheimer", coordinato dal Dr. C. Bertoni-Freddari, afferente all'INRCA di Ancona. Abbiamo avuto a disposizione per le nostre indagini il cervelletto (CBL), la corteccia frontale

(CxF) e temporale (CxT) di animali adulti e anziani (età media 10.1 e 19.5 anni rispettivamente). Poiché in questi ultimi non sono state individuate placche senili nella corteccia temporale e frontale (Bertoni-Freddari, comunicazione personale), possiamo affermare che le modificazioni del sistema ubiquitina-proteasoma età associate si riferiscono ad un invecchiamento di tipo fisiologico o precedente all'insorgenza dei marcatori istopatologici tipici dell'AD. Come prima indagine abbiamo verificato l'espressione del proteasoma costitutivo, dell'immunoproteasoma e del complesso regolatore PA28 nelle tre aree cerebrali sopra citate. Dall'analisi dei dati ottenuti mediante Western blotting è emerso che l'immunoproteasoma, rivelato attraverso l'anticorpo specifico per LMP2, è presente in tutte e tre le aree considerate, negli animali anziani ma anche in quelli adulti. Questo risultato è stato inatteso rispetto a quanto abbiamo precedentemente riportato per l'uomo, soprattutto se si considera che la vita media di questi animali è circa un terzo di quella dell'uomo e che l'età media degli animali adulti è in proporzione simile a quella dei controlli giovani umani. Abbiamo quindi cercato di verificare se i livelli di espressione potessero essere in parte modulati dal processo di invecchiamento ma, diversamente da quanto atteso, non abbiamo riscontrato nessuna variazione età-correlata nella quantità di immunoproteasoma. Possiamo tentare di interpretare questo risultato ipotizzando che i processi infiammatori cerebrali che caratterizzano l'invecchiamento nell'uomo e nei primati non umani della specie *M.fascicularis* seguano un diverso decorso e che in questo modello animale lo stato pro-infiammatorio possa svilupparsi più precocemente. Per poter dimostrare ciò avremmo dovuto avere a nostra disposizione animali giovani (età <10 anni), che purtroppo non erano disponibili. Inoltre, poiché nell'uomo abbiamo studiato l'ippocampo e nei primati della specie *M.fascicularis* il cervelletto, la corteccia frontale e temporale potremmo ipotizzare che le differenze da noi riscontrate siano attribuibili ad una diversa regolazione dell'espressione dell'immunoproteasoma in aree cerebrali differenti. In particolare, un recente studio condotto *in vitro* su cellule di feocromocitoma PC12 e *in vivo* su topi ha evidenziato che l'espressione neuronali di LMP2, LMP7 ed altri componenti del sistema MHC I è regolata, direttamente od indirettamente non è ancora stato ben chiarito, da Zif268 (Egr-1, Krox24, NGF-IA) (James et al., 2006). Si tratta di un fattore di trascrizione che svolge diverse funzioni e, nel SNC di ratto è espresso

basalmente in maniera area-specifica durante lo sviluppo del cervello ed è indotto in seguito ad alcuni fenomeni, tra cui il potenziamento a lungo termine (Beckmann et al., 1997). Inoltre, anche per altri aspetti dell'invecchiamento cerebrale è emerso che specifiche aree risultano essere più vulnerabili al danno di altre (Keller, 2005). Da ultimo va considerato che non abbiamo potuto verificare la presenza di altre immunosubunità e della controparte costitutiva di LMP2, β 1, per la mancanza di reattività degli anticorpi umani specifici verso le proteine di primati della specie *M.fascicularis*. Molto probabilmente ciò ci avrebbe aiutato in una migliore interpretazione dei dati ottenuti.

Poiché la presenza dell'immunoproteasoma è solitamente accompagnata dall'espressione delle subunità α/β del regolatore PA28, ne abbiamo indagato la presenza nel SNC. Tale complesso regolatore nelle tre aree dei primati non umani è stato rilevato mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico per la subunità PA28 α . Da questa indagine è emerso che il PA28 è presente in CxT, CxF e CBL, sia in animali adulti che anziani. Questo dato ha confermato quanto già riportato in letteratura per il tessuto cerebrale di ratto (Noda et al., 2000). Inoltre, uno studio condotto recentemente ha mostrato, oltre all'espressione dell'immunosubunità LMP2, anche PA28 α nella corteccia frontale, globus pallidus, striato e sostanza nigra di scimmie adulte della specie *Callithrix jacchus* (Zeng et al., 2006). La presenza delle subunità PA28 α e β sia nel nucleo che citoplasma, in diversi modelli cellulari *in vitro* (sia fibroblasti che microglia) (Soza A. et al., 1997) fa ipotizzare anche possibili funzioni non immunologiche, tra cui la regolazione della trascrizione ed il riparo del DNA, particolarmente importante in cellule non replicanti come i neuroni. Poiché in genere il PA28 è espresso nei tessuti a bassi livelli (Stratford et al., 2006) e la sua espressione aumenta in presenza di citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ , ci siamo chiesti, come per l'immunoproteasoma, se il contenuto totale di tale regolatore potesse essere modulato dall'invecchiamento. In accordo con il risultato di LMP2, anche in questo caso, non abbiamo riscontrato nessuna variazione nei livelli di espressione di PA28 tra animali adulti ed anziani, nelle tre aree considerate, dato che indirettamente conferma la validità del dato ottenuto con l'anticorpo anti-LMP2.

Per quanto riguarda il contenuto totale dei proteasomi negli animali delle due fasce di età, abbiamo misurato i suoi livelli mediante l'anticorpo specifico per $\alpha 4$ in CxF, CxT e CBL. Da tale indagine è emerso che non vi sono differenze età associate nel contenuto dei proteasomi in CxT e CBL mentre un incremento al limite della significatività è emerso in CxF di animali anziani. In questa area inoltre abbiamo riscontrato un aumento significativo dei livelli di proteine ossidate, un marcatore di danno indotto da stress ossidativo, negli animali anziani rispetto ai giovani. Poiché la loro eliminazione è proteasoma dipendente ma ubiquitina e ATP indipendente, rappresentano indirettamente un marcatore dell'attività dei proteasomi 20S. Il fatto che questo fenomeno l'abbiamo riscontrato solo nella corteccia frontale e non in quella temporale e cervelletto indica come aree cerebrali differenti siano diversamente suscettibili al danno ossidativo. Inoltre la presenza di proteine ossidate in questa area cerebrale di animali anziani potrebbe aver indotto l'espressione delle subunità α , come già descritto precedentemente, per incentivare l'assemblaggio di nuovi proteasomi per l'eliminazione di queste specie proteiche ed impedire la formazioni di aggregati intracellulare potenzialmente tossici.

Nelle tre aree cerebrali di primati non umani giovani ed anziani abbiamo misurato l'attività catalitica dei proteasomi 20S direttamente attraverso l'utilizzo di substrati fluorogenici. Anche in questo caso è emerso un risultato interessante per cui, in tale modello animale, non ci sono differenze nell'attività proteolitica dei proteasomi tra i due gruppi di animali, in nessuna delle aree analizzate. A questo riguardo il nostro studio si trova in accordo con quello di un altro gruppo, che aveva rilevato un aumento delle proteine ossidate nell'ippocampo di ratti anziani ma nessuna differenza nell'attività del proteasoma rispetto ad animali giovani (Adl El Mohsen et al., 2003). Poiché con i substrati fluorogenici si misura l'attività sia del proteasoma costitutivo che dell'immunoproteasoma, che coesistono anche all'interno della stessa cellula, e considerato che l'immunoproteasoma è più attivo nell'eliminazione delle proteine ossidate (Teoh et al., 2004), il risultato ottenuto nella corteccia frontale di animali anziani può essere interpretato ipotizzando che l'accumulo di proteine ossidate durante l'invecchiamento non dipenda da un'alterata velocità di degradazione ma da altri fattori che ne determinano la produzione. Tra questi ritroviamo un possibile aumento di specie reattive dell'ossigeno a livello dei perossisomi e dei

mitocondri (Bertoni-Freddari et al., 2006), a seguito di alcune risposte quali l'infiammazione o alterazioni metaboliche, o una diminuzione dell'efficienza dei sistemi di riparo, come già riportato in letteratura, o della degradazione proteasoma indipendente (autofagia mediata dalle chaperonine) descritta per alcuni tipi di proteine (Friguet, 2006).

Tuttavia, la subunità LMP2 svolge un ruolo centrale nel modulare l'attività dell'immunoproteasoma e nel controllare diversi aspetti che regolano la sopravvivenza neuronale (Hayashi et al., 2000; Ding et al., 2006a). Poiché non erano disponibili nei data-base le sequenze nucleotidiche e proteiche di tale immunosubunità nella specie *M.fascicularis*, nell'ultima parte del nostro studio ci siamo concentrati su questo aspetto e abbiamo elaborato anche un modello strutturale *in silico* dell'immunoproteasoma umano contenente la proteina LMP2 di primati non umani. Dopo aver estratto l'RNA totale dal tessuto cerebrale da diversi animali, mediante RT-PCR abbiamo amplificato la sequenza corrispondente all'intero messaggero di LMP2. Dalla reazione di sequenziamento e dall'allineamento con la sequenza LMP2 umana sono emerse numerose varianti nucleotidiche tra le due specie. Tuttavia, solo alcune di queste hanno portato ad una modifica dell'amminoacido corrispondente; si tratta delle posizioni M14V, S87T, F133Y, I173V, E39Q e R106H, dove la prima lettera fa riferimento all'amminoacido nella sequenza umana. Le prime quattro variazioni amminoacidiche risultano essere conservative, in quanto il nuovo residuo presenta le stesse caratteristiche chimico-fisiche e probabilmente non porta a nessuna variazione nell'attività dell' immunosubunità. Al contrario, la presenza di Q39 e H106 nei primati non umani determina un cambiamento della carica netta della subunità catalitica ed una possibile diversa interazione con le subunità α . Dall' elaborazione di un modello strutturale *in silico* del *core* 20S umano contenente la sequenza di LMP2 di primati non umani è emerso che tali sostituzioni indeboliscono le interazioni elettrostatiche rispettivamente con i residui K226 e D144 delle subunità α 1 ed α 7. Ciò modifica negativamente le forze che tengono unite le subunità α e β e, poichè le posizioni 39 e 106 si trovano in prossimità di un canale interno dell'immunoproteasoma, potrebbero rendere più aperto ed accessibile tale passaggio ai polipeptidi che fuoriescono dal camera proteolitica. Tuttavia le subunità α 1 ed α 7 dei primati non umani

potrebbero contenere a loro volta delle variazioni amminoacidiche in grado di compensare tali sostituzioni. In particolare, è nota la sequenza della subunità $\alpha 1$ del proteasoma 20S degli animali della specie *M.fascicularis* e solo una posizione (Q60R) risulta differente da quella umana. E' ancora in corso l'analisi delle altre sequenze del proteasoma di *M.fascicularis* ed il loro possibile effetto sulla struttura del complesso stesso.

In conclusione, da questo studio del sistema ubiquitine-proteasoma nel SNC è emerso che la sua composizione si modifica durante l'invecchiamento umano, sia in quello fisiologico, che più marcatamente in quello patologico e che tale processo è guidato dalla presenza di uno stato pro-infiammatorio cronico. Le stesse modificazioni le abbiamo riscontrate anche nei primati non umani non solo anziani ma anche adulti, ad indicare probabilmente che in questi animali lo stato pro-infiammatorio si sviluppa precocemente. Inoltre, alcune modificazioni tipiche della senescenza sembrano essere area- specifiche, ad indicare una diversa suscettibilità di alcuni circuiti alla neurodegenerazione.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abd El Mohsen M.M., Irvani M.M., Spenser J.P.E., Rose S., Fahim A.T., Motawi T.M.K., Ismail N.A.F., Jenner P.** Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 2005; 336: 386-391.
- Amici M., Lupidi G., Angeletti M., Fioretti E., Eleuteri A.M.** Peroxynitrite-induced oxidation and its effects on isolated proteasome systems. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34: 987-996.
- Bales K.R., Du Y., Holtzman D., Cordell B., Paul S.M.** Neuroinflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/A β -induced glial activation, NF- κ B, and apolipoprotein E. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 427-432.
- Beckmann A.M., Wilce P.A.** Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int.* 1997; 31(4): 477-510.
- Bertoni-Freddari C., Fattoretti P., Fusoli T., Di Stefano G.** Neurobiology of the aging brain. In Conn M, ed. *Handbook of Models for the study of human aging*. St. Louis: Elsevier, 2006, 485-506.
- Braak H., Braak E.** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82: 239-259.
- Bulteau A.L., Petropoulos I., Friguet B.** Age-related alteration of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp. Gerontol.* 2000; 35: 767-777.
- Cardozo C., Michaud C.** Proteasome-mediated degradation of tau proteins occurs independently of the chymotrypsin-like activity by a non-processive pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 408(1): 103-110.
- Carrard G., Bulteau A.L., Petropoulos I., Friguet B.** Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002; 34: 1461-1474.
- Carrard G., Dieu M., Raes M., Toussaint O., Friguet B.** Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003; 34: 1-12.
- Cascio P., Call M., Petre B.M., Walz T., Goldberg A.L.** Properties of the hybrid form of the 26S proteasoma containing both 19S and PA28 complexes. *The EMBO J.* 2002; 21(11): 2636-2645.

- Checler F., Da Costa C.A., Anciolio K., Chevallier N., Lopez-Perez E., Marambaud P.** Role of the proteasome in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1502: 133-138.
- Chiechanover A.** The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO J.* 1998; 17(24): 7151-7160.
- Chiechanover A.** Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6: 79-86.
- Chomezynski P., Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-159.
- Chomezynski P.** A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-536.
- Chondrogianni N., Petropoulos I., Franceschi C., Friguet B., Gonos E.S.** Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp. Gerontol.* 2000, 35: 721-728.
- Chondrogianni N., Stratford F.L.L., Trougakos I.P., Friguet B., Rivett A.J., Gonos E.S.** Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 28026-28037.
- Chondrogianni N., Gonos E.S.** Proteasome dysfunction in mammalian aging: step and factors involved. *Exp. Gerontol.* 2005; 40: 931-938.
- Collins G.A., Tansey W.P.** The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr. Opin. Gen. Devel.* 2006; 16: 197-202.
- Davies K.J.A.** Degradation of oxidised proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 2000; 83: 301-310.
- De Martino G. N., Slaughter C.A.** The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(32): 22123-22126.
- Deng G.Y., Muir A., Maclaren N.K., She J.X.** Association of LMP2 and LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 56(2): 528-534.

- DiAntonio A., Hicke L.** Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. *Annu. Rev. Neurosci.* 2004; 27: 223-246.
- Díaz-Hernández M., Hernández F., Martín-Aparicio E., Gómez-Ramos P., Morán M.A., Castaño J.G., Ferrer I., Avila J., Lucas J.J.** Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's Disease. *J. Neurosci.* 2003; 23: 11653-11661.
- Dick T.P., Nussbaum A.K., Deeg M., Heinemeyer W., Groll M., Schirle M., Keilholz W., Stevanovic S., Wolf D.H., Hubert R., Rammensee H.G., Schild H.** Contribution of proteasomal β -subunit to the cleavage of peptide substrate analysis with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (40): 25637-25646.
- Ding Q., Keller J.N.** Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31(5): 574-584.
- Ding Q., Reinacker K., Dimayuga E., Nukala V., Drake J., Butterfield D. A., Dunn Y. C., Martin S., Bruce-Keller A.J., Keller J. N.** Role of the proteasome in protein oxidation and neural viability following low-level oxidative stress. *FEBS Letters* 2003; 546: 228-232.
- Ding Q., Bruce-Keller A.J., Chen Q., Keller J.N.** Analysis of gene expression in neuronal subject to chronic proteasome inhibition. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36(4):445-455.
- Ding Q., Martin S., Dimayuga E., Bruce-Keller A.J., Keller J.N.** LMP2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins. *Antiox. Redox Signaling* 2006a; 8: 130-135.
- Ding Q., Dimayuga E., Markesbery W.R., Keller J.N.** Proteasome inhibition induce reversible impairments in protein synthesis. *FASEB J.* 2006b; 20(8): 1055-1063.
- Ding Q., Dimayuma E., Keller J.N.** Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid. Redox Signal.* 2006c; 8(1-2): 163-172.
- Ehlers M.D.** Activity level controls post-synaptic composition and signalling via the ubiquitina-proteasome system. *Nat. Neurosci.* 2003; 6: 231-242.
- Fagiolo U., Cossarizza A., Fanales-Belasio E., Ortolani C., Cozzi E., Monti D., Franceschi C., Paganelli R.** Increased cytokine production in

- mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 2375-2378.
- Ferrington D.A., Husom A.D., Thompson L.V.** Altered proteasome structure, function and oxidation in aged muscle. *FASEB J.* 2005; 19: 644-646.
- Floyd R.A., Hensley K.** Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging.* 2002; 23(5):795-807.
- Foster J.A., Quan N., Stern E.L., Kristensson K., Herkenham M.** Induced neuronal expression of class I major histocompatibility complex mRNA in acute and chronic inflammation models. *J. Neuroimmunol.* 2002; 131(1-2): 83-91.
- Franceschi C., Bonafé M., Valensin S.** Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 2000a; 18(16): 1717-1720.
- Franceschi C., Valensin S., Bonafé M., Paolisso G., Yashin A.I., Monti D., De Benedictis G.** The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp. Gerontol.* 2000b; 35: 879-896.
- Friguet B.** Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Letters* 2006; 580(12):2910-2916.
- Frisan T., Levitsky V., Masucci M.G.** Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-Lymphoma lines and normal B cells. *Int. J. Cancer* 2000; 88: 881-888.
- Gaczynska M., Goldberg A.L., Tanaka K., Hendil K.B., Rock K.L.** Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon- γ -induced subunits LMP2 and LMP7. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(29): 17275-17280.
- Gaczynska M., Osmulski P.A., Ward W.F.** Caretaker or undertaker? The role of the proteasome in aging. *Mech. Aging Dev.* 2001; 122: 235-254.
- Glynn R., Kerr L.A., Mockridge I., Beck S., Kelly A., Trowsdale J.** The major histocompatibility complex-encoded proteasoma component LMP7: alternative first exons and post-translational processing. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 860-866.

- Goldberg A.L.** Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003; 426: 895-899.
- Gray D.A., Tsirigotis M., Woulfe J.** Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2003; 34: RE6.
- Grillari J., Katinger H., Voglauer R.** Aging and ubiquitinome: traditional and non-traditional functions of ubiquitin in aging cells and tissues. *Exp. Gerontol.* 2006, *in press*.
- Grune T.** Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology* 2000; 1: 31-40.
- Grune T., Jung T., Merker K., Davies K.J.A.** Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and “aggresomes” during oxidative stress, aging and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 2519-2530.
- Hayashi T., Faustman D.** Essential role of human leukocyte antigen-encodded Proteasome subunits in NF- κ B activation and prevention of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 5238-5247.
- Hershko A., Ciechanover A.** The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 425-479.
- Huang T.T, D’Andrea A.D.** Regulation of DNA repair by ubiquitination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2006; 7: 323-334.
- Husom A.D, Peters E.A., Kolling E.A., Fugere N.A., Thompson L.V., Ferrington D.A.** Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 421(1): 67-76.
- James A.B., Conway A-M., Morris B.J.** Genomic profiling of the neuronal target genes of the plasticity-related transcription factor –Zif268. *J. Neurochem.* 2005; 95: 796-810.
- James A.B., Conway A-M., Morris B.J.** Regulation of the neuronal proteasome by Zif268. *J. Neurosci* 2006; 26(5): 1624-1634.
- Keck S., Nitsch R., Grune T., Ullrich O.** Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brain of patients with Alzheimer’s disease. *Journal Neurochem.* 2003; 85: 115-122.
- Keller J.N., Hanni K.B., Markesbery W.R.** Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2000a; 75(1): 436-439.

- Keller J.N., Hanni K.B., Markesbery W.R.** Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.* 2000b; 113: 61-70.
- Keller J.N., Gee J., Ding Q.** The proteasome in brain aging. *Ageing Res. Rev.* 2002; 1(2): 279-293.
- Keller J.N., Dimayuga E., Chen Q., Thorpe J., Gee J., Ding Q.** Autophagy, proteasome, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 6: 2376-2391.
- Keller J.N., Schmitt F.A., Scheff S.W., Ding Q., Chen Q., Butterfield D.A., Markesbery W.R.** Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 2005; 64: 1152-1156.
- Keller J.N.** Interplay between oxidative damage, protein synthesis and protein degradation in Alzheimer's disease. *J. Biomed. Biotech.* 2006; ID12129; 1-3.
- Kimura N., Tanemura K., Nakamura S.-I., Yakashima A., Ono F., Sakakibara I., Ishii Y., Kyuwa S., Yoshikawa Y.** Age-related changes of Alzheimer's disease-associated proteins in cynomolgus monkey brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 310:303-311.
- Kimura N., Yanagisawa K., Terao K., Ono F., Sakakibara I., Ishii Y., Kyuwa S., Yoshikawa Y.** Age-related changes of intracellular A β in cynomolgus monkey brains. *Neuropath. Applied Neurobiol.* 2005; 31: 170-180.
- Kisselev A.F., Kaganovich D., Goldberg A.L.** Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic site promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 22260-22270.
- Kloetzel P.M.** Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2: 179-186.
- Kloetzel P.M.** Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* 2004, 5(7): 661-669.
- Krüger E., Kloetzel P.M., Enenkel C.** 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* 2001; 83: 289-293.
- Lane A.M.** Nonhuman primate models in biogerontology. *Exp. Gerontol.* 2000; 35: 533-541.

- Lee C.K., Weindruch R., Prolla T.A.** Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature Genetics* 2000; 25(3): 294-297.
- Lim J.K., Hunter J., Fernandez-Vina M., Mann D.L.** Characterization of LMP polymorphism in homozygous typing cell and a random population. *Human Immunol.* 1999; 60: 145-151.
- Lu T., Pan Y., Kao S-Y., Li C., Kohane I., Chan J., Yanker B.A.** Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 2004; 429 : 883-891.
- Maksymowych W.P., Suarez-Almazor M., Chou C.T., Russell A.S.** Polymorphism in the LMP2 gene influences susceptibility to extraspinal disease in HLA-B27 positive individuals with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 1995; 54(4): 321-324.
- Maksymowych W.P., Tao S., Vaile J., Suarez-Almazor M., Ramos-Remus C., Russell A.S.** LMP2 polymorphism is associated with extraspinal disease in HLA-B27 negative Caucasian and Mexican Mestizo patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 2000; 27(1): 183-189.
- Martin L.J., Pardo C.A., Cork L.C., Price D.L.** Synaptic pathology and glial responses to neuronal injury precede the formation of senile plaques and amyloid deposits in the aging cerebral cortex. *Am. J. Pathol.* 1994; 145(6): 1358-1381.
- Martinez-Vicente M., Sovak G., Cuervo A.M.** Protein degradation and aging. *Exp. Gerontol.* 2005; 40: 622-633.
- Marvanová M., Ménager J., Bezard E., Bontrop R.E., Pradier L., Wong G.** Microarray analysis of nonhuman primates: validation of experimental models in neurological disorders. *FASEB J.* 2003; 17(8): 929-931.
- McGeer L., McGeer E.** Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. *J. Neurovirol.* 2002; 8(6): 529-38.
- Meiners S., Heyken D., Weller A., Ludwing A., Stangl K., Kloetzel P.M., Kruger E.** Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and *de novo* formation of mammalian proteasomes. *J. Biol. Chem.* 2006; 278(24): 21517-21525.
- Mengual E., Arizti P., Rodrigo J., Gimenez-Amaya J.M., Castano J.G.** Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular

localization of the proteasome in the rat CNS. *J. Neurosci.* 1996; 16: 6331-6341.

Mishto M., Bonafè M., Salvioli S., Olivieri F., Franceschi C. Age dependent impact of LMP polymorphisms on TNF α -induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Gerontol.* 2002; 37: 301-308.

Mishto M., Santoro A., Bellavista E., Bonafé M., Monti D., Franceschi C. Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing Res. Rev.* 2003; 2: 419-432.

Mishto M., Santoro A., Bellavista E., Sessions R., Textoris-Taube K., Dal Piaz F., Carrard G., Forti K., Salvioli S., Friguet B., Kloetzel P.M., Rivett A.J., Franceschi C. A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localization and insight into regulatory mechanisms. *Biol. Chem.* 2006; 387: 417-429.

Nandi D. Tahiliani P., Kumar A., Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci* 2006; 31(1): 137-155.

Neumann H., Cavalie A., Jenne D.E., Wekerle H. Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 1995; 269(5223): 549-52.

Nussbaum A.K, Dick T.P, Keilholz W., Schirle M., Stevanovic S., Dietz K., Heinemeyer W., Groll M., Wolf D.H., Huber R., Rammensee H-G., Schil H. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasoma β subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1198, 95: 12504-12509.

Noda C., Tanahashi N., Shimbara N., Hendil K.B., Tanaka K. Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 2000; 277: 348-354.

Piccinini M., Mostert M., Croce S., Baldovino S., Papotti M., Rinaudo M.T. Interferon- γ -inducible subunits are incorporated in human brain 20S proteasome. *J. Neuroimmunol.* 2003; 135: 135-140.

Pickart C.M., Cohen R.E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 177-187.

- Ponnappan U., Zhong M., Trebilcock G.U.** Decrease proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: a role in immune senescence. *Cell. Immunol.* 1999; 192: 167-174.
- Preece P., Cairns N.J.** Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Mol. Brain. Res.* 2003; 118(1-2): 60-71.
- Pryhuber K.G., Murray K.J., Donnelly P., Passo M.H., Maksymowych W.P., Glass D.N., Giannini E.H., Colbert R.A.** Polymorphism in the LMP2 gene influences disease susceptibility and severity in HLA-B27 associated juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1996; 23(4): 747-752.
- Rechsteiner M., Hill C.P.** Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* 2005; 15(1): 27-33.
- Reinheckel T., Sitte N., Ullrich O., Kuckelkorn U., Davies K.J.A, Grune T.** Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem. J.* 2003; 335: 637-642.
- Rivett A.J., Bose S., Pemberton A.J., Brooks P., Onion D., Shirley D., Stratford F.L.L., Forti K.** Assay of proteasome activity in relation to aging. *Exp. Gerontol.* 2002; 37: 1217-1222.
- Rock K.L., Goldberg A.L.** Degradation of cell proteins and the generation of MHC class-I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 739-779.
- Rubinsztein D.C.** The role of intracellular protein-degradation pathway in neurodegeneration. *Nature* 2006; 443: 780-786.
- Schmidtke G., Schmidt M., Kloetzel P.M.** Maturation of mammalian 20S proteasome: purification and characterization of 13S and 16S proteasome precursor complexes. *J. Mol. Biol.* 1997; 268: 95-106
- Schmidtke G., Emch S., Groettrup M., Holzhütter H.G.** Evidence for the existence of a non- catalytic modifier site of peptide hydrolysis by the 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(29): 22056-22063.
- Schwartz A.L., Ciechanover A.** The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human disease. *Annu. Rev. Med.* 1999; 50: 57-74.

- Singal D.P, Ye M., Quadri S.A.** Major histocompatibility-encoded human proteasome LMP2. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(4): 1966-1970.
- Soza A., Knuehl c., Groettrup M., Henklein P., Tanaka K., Kloetzel P.M.** Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28. *FEBS Letters* 1997; 413(1): 27-34.
- Stratford F.L.L., Chondrogianni N., Trougakos I.P., Gonos E.S., Rivett A.J.** Proteasome response to interferon- γ is altered in senescent human fibroblasts. *FEBS Letters* 2006; 580(16): 3989-3994.
- Strehl B., Seifert U., Kruger E., Heink S., Kuckelkorn U., Kloetzel P.M.** Interferon- γ , the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system and MHC class I antigen processing. *Immunological Rev.* 2005; 207: 19-30.
- Sullivan P.G., Dragicevic N.B., Deng J.H., Bai Y., Dimayuga E., Ding Q., Chen Q., Bruce-Keller A.J., Keller J.N.** Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(20): 20699-20707.
- Tanaka K., Tanahashi N., Tsurumi C., Yokota K., Shimbara N.** Proteasomes and antigen processing. *Advances Immunol.* 1997; 64: 1-38.
- Teoh C.Y. and Davies K.J.A.** Potential role of protein oxidation and immunoproteasoma in MHC class I antigen presentation: the 'PrOxI' hypothesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 423: 88-96.
- Terao A., Apte-Deshpande A., Dousman L., Morairty S., Eynon B.P., Kilduff T.S., Freund Y. R.** Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *J. Neuroimmunol.* 2002; 132: 99-112.
- Toes R.E.M., Nussbaum A.K., Degermann S., Schirle M., Emmerich N.P.N., Kraft M., Laplace C., Zwinderman A., Dick P.T., Muller J., Schonfisch B., Schmidt C., Fehling H.J., Stevanovic S., Rammensee H.G., Schild H.** Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 2001; 194(1): 1-12.
- Van Leeuwen F.W., Gerez L., Benne R., Hol E.M.** +1 Proteins and aging. *J. Biochem. Cell Biol.* 2002; 34: 1502-1505.
- Vinasco J., Fraile A., Nieto A., Beraun Y., Pareja E., Maratan L., Martin J.** Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-

restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1998; 57: 33-37.

Wang H.X., Wang H.M., Li Q.L., Lin H.Y., Qian D., Zhu C. Expression of proteasome subunit low molecular mass polypeptide (LMP)2 and LMP7 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*Macaca Mulatta*) during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 2004; 71(4): 1314-1324.

Xiao B., Link H. Immune regulation within the central nervous system. *J. Neurol. Sci.* 1998; 157: 1-12.

Xie Y., Vershavsky A. RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(6): 3056-3061.

Yewdell J.W, Reits E, Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 3: 952-961.

Zanelli E., Zhou P., Cao H., Smart M.K., David C.S. Genomic organization and tissue expression of the mouse proteasome gene *Lmp-7*. *Immunogenetics* 1993; 38(6): 400-407.

Zeng B.-Y., Medhurst A.D., Jackson M., Rose S., Jenner P. Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. *Mech. Aging. Dev.* 2005; 126: 760-766.

Zeng B.-Y., Irvani M.M., Lin S.-T., Irifune M., Kuoppamaki M., Al-Barghouthy G., Smith L., Jackson M.J., Rose S., Medhurst A.D., Jenner P. MPTP treatment of common marmosets impairs proteasomal enzyme activity and decreases expression of structural and regulatory elements of the 26S proteasome. *Eur. J. Neurosc.* 2006; 23: 1766-1774.

Zhou P., Zanelli E., Smart M., David C. Genomic organization and tissue expression of mouse proteasome gene *LMP2*. *Genomics* 1993; 16:664-668.

BANCHE DATI CONSULTATE:

NCBI (National Center for Biotechnology Information): www.ncbi.nlm.nih.gov/

Publicazioni durante i tre anni di dottorato

- 1.** Mishto M., **Bellavista E.**, Santoro A., Stolzing A., Logorio C., Nacmias B., Spazzafumo L., Chiappelli M., Licastro F., Sorbi S., Pession A., Ohm T., Grune T., Franceschi C. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Aging.* 2006; 27: 54-66.
- 2.** Mishto M., Santoro A., **Bellavista E.**, Sessions R., Textoris-Taube K., Dal Piaz F., Carrard G., Forti K., Salvioli S., Friguet B., Kloetzel P.M., Rivett A.J., Franceschi C. A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localization and insight into regulatory mechanisms. *Biol. Chem.* 2006; 387: 417-429.
- 3.** Salvioli S., Olivieri F., Marcheggiani F., Cardelli M., Santoro A., **Bellavista E.**, Mishto M., Invidia L., Capri M., Valensin S., Sevini F., Cevenini E., Celani L., Lescai F., Gonos E., Caruso C., Paolisso G., De Benedictis G., Monti D., Franceschi C. Genes, ageing and longevity in humans: Problems, advantages and perspectives. *Free Rad. Res.* 2006; 40(12): 1303-1323.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare tutti coloro che hanno permesso la realizzazione di questo lavoro fornendo le competenze, l'esperienza, il materiale biologico ed il supporto morale. In particolare:

L'Università di Bologna, il Centro Interdipartimentale L. Galvani, il Dipartimento di Patologia Sperimentale, il Coordinatore del Dottorato di Ricerca in Oncologia e Patologia Sperimentale per avermi dato la possibilità di conseguire il titolo di dottorato; tutti i coautori del lavoro "Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Ageing*. 2006", in particolare il Dott. Tilman Grune, del Research Institute of Environmental Medicine, Heinrich Heine University di Duesseldorf per aver fornito i campioni di tessuto cerebrale umani utilizzati nello studio e per i suoi preziosi consigli; il Professor Thomas Ohm e la Dott.ssa Alexandra Stolzing della Humboldt University di Berlino, per gli studi sull'attività del proteasoma nel tessuto cerebrale umano; la Professoressa Annalisa Pession e la Dott.ssa Claudia Ligorio del Dipartimento di Scienze Oncologiche dell' Ospedale Bellaria di Bologna per gli studi di immunoistochimica. Vorrei ringraziare inoltre il Dott. Carlo Bretoni-Freddari e la Dott.ssa Patrizia Fattoretti per aver fornito il materiale biologico dei primati non umani, per i consigli nello svolgimento del lavoro e nella preparazione della tesi; il Dott. Richard Sessions del Dipartimento di Biochimica dell'Università di Bristol per aver elaborato il modello *in silico* dell'immunoproteasoma 20S il Professor Giovanni Romeo dell' Unità di Genetica Medica dell' Università di Bologna per aver concesso l'utilizzo del sequenziatore ABI 3730;.

Un ringraziamento particolare al Prof Franceschi, per aver creduto in me, per avermi trasmesso la passione e la tenacia necessaria per compiere questo lavoro; alla Dott.ssa Aurelia Santoro, che, oltre ad essere una compagna di lavoro, è prima di tutto un'amica ed un riferimento insostituibile nella mia vita...grazie di cuore!Un ringraziamento speciale al Dottor Michele Mishto, per aver permesso la mia crescita all'interno mondo del proteasoma, per i consigli, l'aiuto costante e per tutto quello che abbiamo condiviso in questi anni. Ringrazio poi il Dott. Stefano Salvioli per la sua disponibilità e i preziosi suggerimenti; tutte le

persone che popolano il laboratorio di Immunologia, per quello che abbiamo condiviso in questi anni, dal duro lavoro alle pause pranzo, le feste ed il supporto in momenti molto importanti della mia vita...grazie mille!

E naturalmente non può mancare lei, Martina, la gioia più grande che ogni donna possa sperimentare, che non mi fa mai sentire sola anche quando siamo lontane, che mi ha insegnato a fidarmi del mio istinto e a non essere troppo severa con me stessa. Per tutto quello che abbiamo vissuto e ciò che ci attende mille volte grazie. A Gianluca, il mio compagno di vita, per essere sempre al mio fianco e per sopportare con pazienza tutte le mie paranoie. Ai miei genitori ed ai miei nonni, che hanno creduto in me e mi hanno sempre supportato, e continuano a farlo, con il loro amore. Ad Angelo, Rosina ed Ivana, per il loro aiuto quotidiano. Alle amiche di sempre: Nicole, Federica, Francesca, Chiara, Sara, Valentina, Maila, Serena perché, anche se ormai gli impegni della giornata ci assorbono completamente, hanno sempre un posto nel mio cuore. A tutti quelli che non ho nominato ma che fanno parte di me, grazie mille.