Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
*Memorie di Scienze Fisiche e Naturali*
118° (2000), Vol. XXIV, pp. 27-32

PIETRO CALISSANO *

# Morte neuronale programmata ed eventi riferibili al morbo di Alzheimer **

Il nostro istituto fin dal momento della sua creazione, avvenuta nel 1986, impiega colture di neuroni per studiare quella crescente categoria di fattori di crescita che, dopo la scoperta del primo di essi da parte della Levi Montalcini e denominato *nerve growth factor* o *NGF*, viene definita con il termine di neurotrofine. Uno dei fenomeni più curiosi che è emerso nell'ultimo decennio è che la proprietà di queste neurotrofine di esercitare la loro azione trofica non consiste, come quella ad esempio delle vitamine, nell'esplicare una funzione «vitale» per la sopravvivenza delle cellule bersaglio, funzione che ha suggerito la loro denominazione di ammine vitali. Le neurotrofine, infatti, come molti altri fattori di crescita o numerosi ormoni, esercitano la loro attività «vitale» tramite il «blocco» di un programma di morte presente nel DNA di tutti i neuroni e delle altre cellule dell'organismo.

La scoperta dell'esistenza di questo programma costituisce uno degli eventi più significativi dell'ultimo decennio delle ricerche biologiche. Il fatto che nel DNA di ogni cellula esista un programma che, quando attivato, provoca la morte della cellula, può sembrare a prima vista una specie di anomalia della natura che, nella comune accezione di madre, è sempre tesa alla sopravvivenza delle sue creature. In realtà, questo programma dalla sinistra denominazione ci salvaguarda dalle malattie più micidiali, inclusi i tumori, poiché è grazie ad esso che ogniqualvolta una cellula «impazzisce» e tende a divenire anarchica ed a sfuggire alle regole dell'organismo questo programma di morte viene attivato e la cellula viene eliminata. La morte cellulare programmata viene anche denominata apoptosi (dal greco ἀπό, πτῶσις, cioè caduta delle foglie o dei petali dei fiori) poiché il connotato morfologico più rile-

* Socio dell'Accademia. Istituto di Neurobiologia C.N.R., Viale C. Marx 15, 00137 Roma.
** Prolusione per l'inaugurazione del 218° Anno Accademico. Roma, 30 marzo 2000. Teatro dei Dioscuri, Via Piacenza 1.

vante, osservato dai primi ricercatori che descrissero il fenomeno [1] nelle cellule epiteliali era appunto una desfoliazione delle cellule.

L'apoptosi svolge un ruolo importante nel corso dello sviluppo del sistema nervoso. Alla nascita, infatti, siamo dotati di un numero di neuroni largamente eccedente quello necessario e tutti quelli che nei primi anni di vita non formano i collegamenti nervosi appropriati debbono essere eliminati per evitare una loro interferenza sull'attività di quelli che hanno formato i circuiti. Questo è un modo di procedere abbastanza comune in natura: si produce in eccesso ed in seguito, tutto ciò che risulta superfluo viene eliminato.

L'apoptosi svolge un ruolo fondamentale non solo nel corso dello sviluppo del sistema nervoso ma anche nell'adulto, quando una cellula nervosa invecchia e deve essere eliminata. In effetti ciò avviene di consueto, ma di per sé non costituisce una causa di grave perdita funzionale perché questo lento ma inesorabile depauperamento è minimo rispetto alla dote iniziale che abbiamo e perché colpisce più o meno tutti i distretti del cervello in modo leggero. Nel morbo di Alzheimer, però, la perdita è molto più massiccia, veloce e concentrata in determinate aree cerebrali principalmente coinvolte nelle attività cognitive.

Come si è accennato, il nostro istituto gode di una notevole esperienza di colture di cellule nervose della più svariata natura. Fra queste, nell'ultimo decennio si è utilizzato per studi di vario tipo le colture di neuroni del cervelletto denominati *granuli*. Sempre di recente, studiando questi granuli, abbiamo dimostrato che essi vanno incontro a morte per apoptosi se sono trattati in modo da simulare l'arresto della loro attività cioè riducendo le concentrazioni di potassio presenti nel mezzo di coltura da 25 mM a 5.0 mM [2, 3]. In base a considerazioni che esulano dallo scopo di questo articolo riassuntivo, ipotizzammo che nel corso del processo apoptotico che colpisce i granuli si verificassero taluni eventi che sono ritenuti fra le cause prime ed irreversibili della degenerazione neuronale che porta *in vivo* ai deficit funzionali caratteristici del morbo di Alzheimer. Questa ipotesi fu presto valutata sfruttando una serie di tecniche sperimentali concordate in collaborazione con M. Tabaton dell'Università di Genova e con A. Cattaneo della SISSA di Trieste.

Esperimenti che sono ancora in corso di effettuazione indicavano che, subito dopo il segnale apoptotico e prima della probabile attivazione di geni killer, si verificano una complessa serie di segnali intracellulari transitori che riguardano principalmente lo stato di fosforilazione di alcune proteine, la produzione di radicali liberi estremamente tossici e l'attivazione di proteasi specifiche che demoliscono particolari proteine intracellulari. Tra queste proteine ve ne sono due che hanno attratto l'attenzione di molti laboratori, perché un'alterazione del loro stato strutturale e funzionale si accompagna alla degenerazione e morte di intere popolazioni neuronali che fanno parte di aree cerebrali che presiedono ai processi cognitivi. Queste due proteine sono note come *tau* e *beta-amiloide*. Neurobiologi e neuropatologi concordano nell'ipotizzare che vi sia una correlazione causale precisa fra le alterazioni che presentano queste proteine nei neuroni delle aree cerebrali colpite e

la morte di quegli stessi neuroni. Il quesito sul quale spesso neurobiologi e neuropatologi si dividono riguarda, invece, se le alterazioni osservate in queste proteine siano la causa primaria o secondaria del processo che provoca la morte dei neuroni ed ancor più quale sia la causa iniziale che genera queste alterazioni strutturali. Il problema, poi, è complicato dal fatto che mentre la funzione di tau come proteina che svolge una funzione essenziale per l'assemblaggio e la stabilità dei microtubuli, che sono parte integrante del citoscheletro, è ben accertata, quale funzione essenziale svolga l'APP (*amiloid precursor protein*) è ancora ignoto.

Nel cervello dei pazienti affetti da morbo di Alzheimer, il citoscheletro dei neuroni, che svolge numerose funzioni fondamentali per la loro vita, viene progressivamente danneggiato e sostituito da strutture denominate *paired helical filaments* o *PHF*, così definite per la loro struttura a filamenti accoppiati. I PHF sono costituiti, principalmente, dalla proteina tau e da forme modificate della stessa proteina. Le modificazioni di maggiore rilevanza sono di due tipi: un eccessivo stato di fosforilazione e la presenza di elementi di degradazione prodotti da proteasi non ancora identificate. Queste forme modificate di tau interferiscono sulla funzione più peculiare del pool di tau ancora normale, cioè quella di mantenere in condizioni normali e funzionanti i microtubuli del citoscheletro. Ne consegue una progressiva disgregazione della trama dei microtubuli devoluta a mantenere la forma tridimensionale del neurone e una riduzione del trasporto assonale. Questo sistema di trasporto interno alle fibre nervose serve a garantire il continuo rifornimento — dal corpo cellulare alle sinapsi e viceversa — di materiale trofico, energetico e di comunicazione con gli altri neuroni. A causa dell'interruzione di questo trasporto e di altri eventi che descriveremo, i neuroni degenerano e vengono eliminati.

Si pensa che l'iperfosforilazione e la degradazione di tau siano anche alla base della sua tendenza ad aggregarsi. Tuttavia gli eventi molecolari intracellulari precoci responsabili di questo fenomeno non sono ancora chiari. Infatti, l'abnorme iperfosforilazione di tau nei PHF, può essere una causa della sua aggregazione — come da alcuni suggerito — ma può anche rappresentare un evento secondario alla formazione dei PHF. Inoltre, poiché i filamenti aggregati sono formati anche da forme degradate di tau, si è ipotizzato che la degradazione di tau sia importante nella fase di transizione dalla sua forma non aggregata a quella aggregata. Di qui l'ipotesi che nella patogenesi del Morbo di Alzheimer si verifichi un'alterazione nel rapporto tra proteasi e loro inibitori. Quali di questi eventi, che caratterizzano il destino di tau *in vivo*, si verificano nei granuli in corso di apoptosi *in vitro*?

Abbiamo osservato che nel corso di questo processo si assiste ad una precoce e progressiva distruzione del sistema dei microtubuli. Come conseguenza, i neuroni si assottigliano, diventano distrofici, si retraggono e la membrana cellulare perde la sua normale organizzazione. Queste lesioni morfologicamente molto eclatanti sono provocate da una notevole e precoce riduzione della quantità di tau legata ai microtubuli [4]. I dati sperimentali a nostra disposizione suggeriscono che questo fenomeno è dovuto al fatto che in corso di apoptosi alcune isoforme di tau vengono

degradate e defosforilate. In particolare abbiamo osservato che la proteina tau viene degradata in maniera specifica con produzione ed accumulo di un frammento di circa 17 kDa. Questo frammento si trova nella frazione libera di tau e non si associa, o si associa solo debolmente ai microtubuli, probabilmente perché contiene solo parte del dominio che permette il legame ad essi. Abbiamo inoltre osservato che alcune isoforme di tau rimangono fosforilate e non vengono degradate in corso di apoptosi, ma contribuiscono a destabilizzare il citoscheletro. Queste isoforme del peso molecolare di circa 60-69 kDa, sono immunologicamente e biochimicamente paragonabili a quelle presenti nei PHF. Sono infatti riconosciute dall'anticorpo monoclonale PHF-1 (che riconosce un epitopo fosforilato in posizione 396 e 404), sono resistenti a diverse proteasi e non sono in grado di legare e quindi stabilizzare i microtubuli. Queste isoforme, così come le forme degradate, rappresentano pertanto una sorgente di molecole di tau potenzialmente in grado di aggregarsi in strutture simili ai PHF. Abbiamo inoltre osservato che, come conseguenza del collasso dei microtubuli, si verifica una ridistribuzione di tau all'interno della cellula, con accumulo nel soma cellulare ed impoverimento lungo la trama neuritica, in modo analogo a quanto si verifica nei neuroni colpiti da degenererazione neurofibrillare.

Se questo è il quadro preliminare «anatomo-molecolare» che abbiamo osservato per quanto riguarda tau, che cosa avviene a carico della beta amiloide? Si tratta di un peptide di 40(42) amminoacidi che contribuisce a formare le *placche senili* riscontrate nel tessuto cerebrale di pazienti affetti da morbo di Alzheimer. Queste placche sono infatti costituite da polimeri di β-amiloide aggregati in fibrille che si accumulano all'esterno dei neuroni malati. La β-amiloide deriva da un precursore detto *amiloid precursor protein* o *APP* che viene fisiologicamente processato da enzimi non ancora isolati detti secretasi. Si conoscono attualmente tre tipi di questi enzimi, denominati alfa, beta e gamma. In condizioni normali l'APP viene degradato dalle secretasi di tipo alfa e dà luogo a peptidi che non sono tossici. Quando, per cause ancora sconosciute, l'APP viene degradato dalle secretasi di tipo beta, si genera il peptide beta-amiloide che, essendo costituito in larga parte da amminoacidi idrofobici, nell'ambiente acquoso extracellulare dove viene secreto si aggrega e forma fibrille che esercitano un'azione tossica sui neuroni vicini. In condizioni normali la quota di produzione di amiloide è trascurabile, e soltanto ingegnerizzando topi transgenici si possono ottenere animali che producono grandi quantità di questo peptide, simulando così una situazione patologica simile al morbo di Alzheimer. Sulla base dell'ipotesi che vi fosse una relazione fra morte cellulare programmata e generazione di beta-amiloide, abbiamo osservato che nel corso di apoptosi da deprivazione di potassio dei neuroni cerebellari si verifica in effetti non solo una secrezione del frammento amiloidogenico di 4 kDa ma anche dei polimeri di peso molecolare più elevato — in particolare di un trimero di 14 kDa — ritenuti i precursori delle fibrille che si riscontrano nella malattia che colpisce l'uomo [5]. Inoltre, se si osservano taluni compartimenti intracellulari delle stesse

cellule in corso di apoptosi, si evidenzia un ingolfamento dello stesso peptide che prelude ad un'incrementata produzione e secrezione dei frammenti amiloidogenici.

Non è ancora chiaro se tali alterazioni del processo in corso di apoptosi siano specifiche della beta-amiloide o siano l'espressione di un disordine enzimatico e secretorio generale che la cellula apoptotica subisce e che quindi riguarda anche altre proteine. Qualunque sia l'ipotesi corretta, le modificazioni che abbiamo riscontrato a carico di due proteine quali tau e APP, quest'ultima con il suo corredo di peptidi tossici, considerato il loro ruolo fondamentale nella patogenesi del morbo di Alzhemer, sono sufficienti ad indurci a concludere che vi sia una stretta correlazione fra eventi molecolari di questo genere e la morte cellulare programmata che osserviamo *in vitro*.

La maggior parte degli studiosi di questo problema pone le alterazioni a carico di tau e di beta-amiloide come causa primaria della morte dei neuroni, eventualmente per apoptosi. Gli studi che stiamo conducendo suggeriscono una correlazione opposta, che queste alterazioni, cioè, siano la conseguenza e non la causa della morte per apoptosi. Laddove poi sia tau che beta amiloide diano luogo alle loro caratteristiche formazioni aggregate di natura neurotossica, si inizierebbe un circolo vizioso di degenerazione e morte per apoptosi dei neuroni sani vicini con conseguente ulteriore secrezione di amiloide ed espansione del processo degenerativo a macchia d'olio [6].

Naturalmente questa ipotesi solleva numerosi interrogativi: quali sono i meccanismi che scatenerebbero il processo apoptotico iniziale, causa della reazione a catena ipotizzata? Perché, fortunatamente, solo in una piccola parte degli anziani, nei quali si verifica comunque una perdita di neuroni «fisiologica», si attiva questo processo «patologico»? Ed infine, come spiegare che pur essendo il APP (precursore dell'amiloide) presente in tutte le cellule, e pur essendo l'apoptosi un evento frequentissimo in ogni distretto dell'organismo, soltanto quelle nervose producono il peptide neurotossico?

Le malattie che colpiscono il cervello dell'uomo sono di difficile comprensione e, conseguentemente, ancor più difficili da curare. Risulta quindi molto utile avere a disposizione modelli sperimentali che, in varia misura e con buona approssimazione, simulino l'insorgere della malattia ed il suo sviluppo fino alla fase terminale di morte neuronale. La possibilità di disporre di una cultura di neuroni che simula, in condizioni strettamente controllate, talune tappe molecolari molto precoci e analoghe a quelle umane del morbo di Alzheimer, potrebbe costituire un sistema di semplice impiego per analizzare l'iniziarsi del processo apoptotico e per cercare le sostanze che inibiscano questo processo. Se ciò si rivelerà fattibile, come gli studi iniziati suggeriscono, potremo concludere che lo spesso deprecato approccio riduzionista ha fornito, per l'ennesima volta, informazioni essenziali non solo per comprendere i meccanismi che presiedono alle funzioni fondamentali dei neuroni ma anche per tentare di prevenire o curare le cellule nelle quali questi meccanismi non funzionano più in modo appropriato e causano malattie invalidanti o letali.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

[1] Kerr, J.P., Wyllie, A.H. and Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26:239-247 (1972).

[2] D'Mello, S., Galli, C., Ciotti, M.T. and Calissano, P., Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10989-10993 (1993).

[3] Galli, C., Meucci, O., Scorziello, A., Werge, T.M., Calissano, P. and Schettini, G., Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin and IGF-I through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J. Neurosci.*, 15:1172-1179 (1995)

[4] Canu, N., Dus, L., Barbato, C., Ciotti, M.T., Brancolini, C., Rinaldi, A.M., Novak, M., Cattaneo, A., Bradbury, A. and Calissano, P., Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule cells undergoing apoptosis. *J. Neurosci.*, 15:7061-7074 (1998).

[5] Galli, C., Piccini, A., Ciotti, M.T., Castellani, L., Calissano, P., Zaccheo, D. and Tabaton, M., Increased amyloidogenic secretion in cerebellar granule cells undergoing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:1247-1252 (1998).

[6] Piccini, A., Ciotti, M.T., Vitolo, O., Calissano, P., Tabaton, M. and Galli, C., Endogenous amyloid precursor protein derivatives oppositely modulate nueuronal apoptosis through an autocrine loop. *Neuro. Report*, (2000) in stampa.