

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA



DOTTORATO DI RICERCA in
SCIENZE BIOMEDICHE, FARMACI E SANITA' PUBBLICA

XIV CICLO

TESI DI DOTTORATO

RUOLO DELLO SCAMBIATORE $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NELLA NEUROTOSSICITA' MEDIATA DALLA CITOCHINA
PROAPOPTOTICA/PROINFIAMMATORIA TNFSF10

Coordinatore e Tutore:
Chiar.mo Prof. Salvatore Amoroso

Candidata:
Dott.ssa Oriana Valerio

Anno Accademico 2015/2016

INDICE

INTRODUZIONE	3
Malattie neurodegenerative	3
Malattia di Alzheimer	6
Terapia della malattia di Alzheimer	9
TRAIL e i suoi recettori	11
TRAIL nella neurodegenerazione	13
Lo scambiatore sodio – calcio (NCX)	15
Regolazione dell'attività di NCX	19
Inibizione farmacologica dell'attività di NCX	21
NCX nella neurodegenerazione	22
SCOPO DEL LAVORO	24
MATERIALI E METODI	25
RISULTATI	29
DISCUSSIONE	44
BIBLIOGRAFIA	46
RINGRAZIAMENTI	56

INTRODUZIONE

Malattie neurodegenerative

Diverse aree del sistema nervoso centrale (SNC) possono essere colpite da patologie che conducono ad una progressiva ed irreversibile riduzione della componente cognitiva e sensitivo-motoria (Bethesda, 1998). Le fasi precoci di queste patologie sono spesso silenziose e difficili da riconoscere, anticipando anche di anni la comparsa dei primi sintomi clinici in pazienti che, in sede di diagnosi definitiva, possono presentare perdite fino al 70% dei motoneuroni o neuroni, minimizzando così la possibilità di intervenire in modo efficace sul processo degenerativo già in atto (Prasad et al., 1999). Sono in via di sviluppo trattamenti farmacologici per prevenire o ritardare la progressione della neurodegenerazione, ma al momento la terapia farmacologica allevia in parte solo i sintomi (Sureda FX et al., 2011). Le malattie neurodegenerative comprendono: il morbo di Parkinson (PD - Parkinson Disease) e la corea di Huntington (HD - Huntington Disease), caratterizzate dalla perdita di neuroni nei gangli della base; la malattia di Alzheimer (AD - Alzheimer Disease), che mostra una tipica perdita di neuroni ippocampali e corticali (McCaulley ME and Grush KA, 2015); la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA - ALS - Amyotrophic Lateral Sclerosis), caratterizzata da degenerazione di motoneuroni spinali, corticali e bulbari (Komine O and Yamanaka K, 2015); la demenza frontotemporale e la demenza dei corpi di Lewy (Lund and Manchester Groups, 1994). Il deterioramento neuronale compromette funzioni cerebrali e si esprime clinicamente con deficit cognitivi, demenza, alterazioni motorie e disturbi comportamentali e psicologici (Henry JD et al., 2016) (Figura 1).

neurodegenerazione - Esempi di malattie neurodegenerative associate a caratteristici aggregati proteici			
MALATTIA	PROTEINA AGGREGANTE	AGGREGATI	LOCALIZZAZIONE/ STRUTTURA
malattia di Alzheimer	peptide β amiloide (A β)	placche amiloidi	extracellulare/ fibrillare
morbo di Parkinson	α -sinucleina (α s)	corpi di Lewy	citoplasma/fibrillare
encefalopatie spongiformi	proteina prionica (PrP)	depositi amiloidi	extracellulare/fibrillare
sclerosi laterale amiotrofica	superossido dismutasi di tipo 1 (SOD1)	inclusioni intranucleari	citoplasma/fibrillare
corea di Huntington	huntingtina (Htt)	inclusioni intranucleari	nucleo/fibrillare
ataxie spinocerebellari	ataxine	inclusioni intranucleari	citoplasma/fibrillare
demenze familiari Britannica e Danese	ABri e ADan	depositi amiloidi	extracellulare/fibrillare
polineuropatia amiloide familiare	transtiretina (TTR)	depositi amiloidi	extracellulare/fibrillare
demenza frontotemporale con istopatologia tau	proteina tau (τ)	corpi di Pick	citoplasma/fibrillare
demenza frontotemporale senza istopatologia tau	TFP-45 (talvolta)	inclusioni ubiquitina-positivi	citoplasma/amorfa
CADASIL	ectodominio Notch-3	-	extracellulare/amorfa

Figura 1. Esempi di malattie neurodegenerative

L'eziologia alla base di questi processi non è stata individuata, tuttavia fattori di rischio di origine sia genetica sia ambientale sembrano giocare un ruolo fondamentale (Chin-Chan M et al., 2015). In particolare, nella forme familiari della malattia di Alzheimer sono state individuate mutazioni a carico dei geni codificanti per la proteina precursore dell'amiloide (APP, amyloid precursor protein) o dei geni della presenilina, entrambe causano un aumento della formazione di A β (Selkoe DJ and Podlisny MB, 2002). Il gene che codifica per APP è localizzato nel cromosoma 21, così le forme demenziali presenti in soggetti con trisomia 21 si attribuiscono all'eccessiva produzione di amiloide (Zempel H and Mandelkow EM, 2015).

Alcuni studi hanno individuato nell'alterato turnover proteico una possibile causa comune per le malattie neurodegenerative (Jackson WS, 2014). Per poter svolgere la propria funzione biologica, le proteine devono assumere la configurazione nativa terziaria attraverso il corretto processo di ripiegamento, detto Folding (Yadahalli S and Gosavi S, 2015). In condizioni normali, le proteine che vanno incontro ad un alterato ripiegamento (misfolding) perdono attività funzionale (Kayed R et al., 2003; Yadahalli S and Gosavi S, 2015) e vengono di norma rimosse da processi di degradazione intracellulari. Generalmente con l'avanzare dell'età, questi sistemi di controllo e difesa tendono a perdere di efficienza, e non riescono a contrastare la formazione di proteine alterate. Così la proteina, incapace a ritornare alla conformazione originale corretta, può essere soggetta a misfolding e condurre all'insorgere di malattie. Le patologie connesse al misfolding hanno come fattore comune l'aggregazione di proteine, normalmente

solubili, in grossi aggregati insolubili che formano depositi tossici nel cervello, nel cuore, nel fegato, nel tessuto scheletrico e muscolare a livello intracellulare o extracellulare (Figura 2) (Jackson WS, 2014). Sono state determinate diverse proteine in conformazione anomala come β - amiloide ($A\beta$) e Tau nella malattia di Alzheimer, α - sinucleina nel morbo di Parkinson, huntingtina nella malattia di Huntington, SOD e TDP-43 nella sclerosi laterale amiotrofica. Nella malattia di Alzheimer, il peptide β - amiloide è considerato il principale componente delle placche extracellulari e la sua proprietà fibrillogena è dovuta alla transizione strutturale da α -elica a foglietto β (Ross CA and Poirier MA, 2004). I principali meccanismi protettivi che limitano l'accumulo di aggregati proteici sono rappresentati dalla produzione di proteine *chaperon* e dalla reazione di "ubiquitinazione" che rappresenta il primo passo per eliminare le proteine all'interno della cellula (Wickner S et al., 1999). Quando questi meccanismi non sono in grado di agire si verifica la formazione e accumulo di depositi proteici.

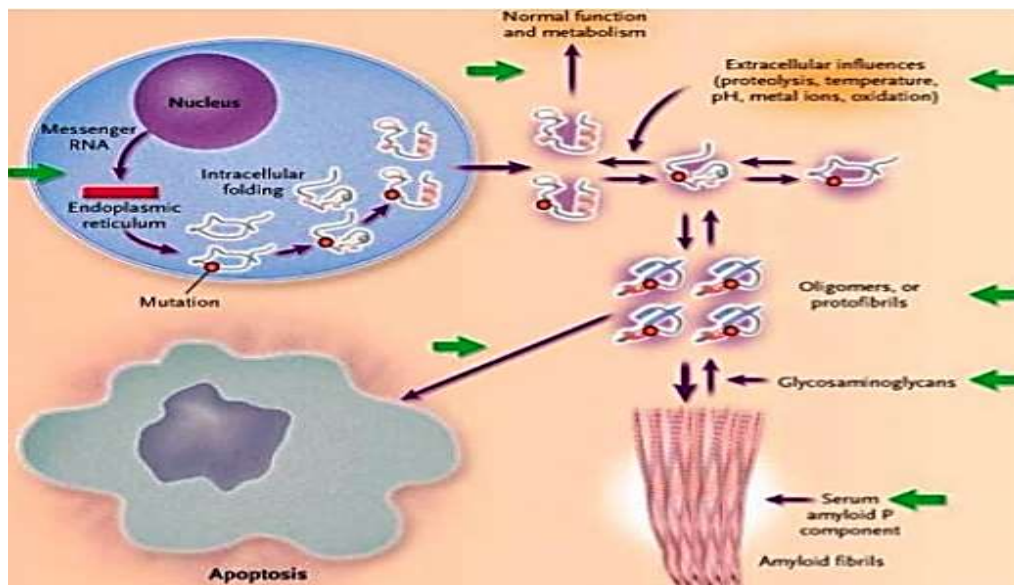


Figura 2. Formazione di fibrille

Malattia di Alzheimer

Ad oggi nel mondo oltre 46 milioni di persone sono affette da una forma di demenza, questa stima è destinata a raddoppiare ogni 20 anni, raggiungendo circa 74 milioni di persone nel 2030 (World Alzheimer Report 2015). Esistono numerose condizioni patologiche che possono indurre uno stato di demenza, delle quali la malattia di Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) ne rappresenta la più comune forma. La sua diffusione aumenta bruscamente con l'età, con un'incidenza del 5% circa a 65 anni e del 90% a 90 anni. AD colpisce gradualmente diverse aree del cervello che controllano funzioni importanti come la memoria, l'apprendimento, il pensiero e la parola (Francis PT et al., 1999). Spesso, pazienti affetti da AD sono incapaci a portare a termine le normali attività quotidiane e nelle fasi più avanzate possono anche manifestare allucinazioni, difficoltà a deambulare e comportamenti inappropriati. Gli stadi terminali sono caratterizzati da una progressione verso uno stadio di acinesia-mutismo e la morte sopraggiunge entro 6-12 anni dall'insorgenza dei primi sintomi. Tra i sintomi è possibile distinguere amnesia anterograda, aprassia, agnosia, anomia, disorientamento spazio-temporale, agrafia, cambiamento del tono dell'umore (Artero et al., 2003). La diagnosi iniziale è di declino cognitivo lieve (MCI mild cognitive impairment) e il 10% dei pazienti con MCI progredisce verso la malattia di Alzheimer (Artero and Ritchie, 2003). Studi post-mortem su cervelli di pazienti affetti da AD hanno permesso di caratterizzare la malattia a livello macroscopico. Nell'AD è possibile distinguere una marcata atrofia a livello cerebrale e una profonda perdita di sinapsi e cellule neuronali che è confinata in specifiche aree del cervello includendo lobo temporale, parietale, corteccia frontale e giro cingolato (Price et al. 1991). In aggiunta alla perdita neuronale e atrofia, si nota la presenza di placche senili, generate da depositi amorfi extracellulari della proteina β -amiloide ($A\beta$), e grovigli neurofibrillari intraneuronali, costituiti dalla forma fosforilata della proteina Tau associata ai microtubuli (Probst A et al., 1991) (Figura 3). Entrambi questi depositi sono aggregati di proteine che derivano da un errato ripiegamento proteico.

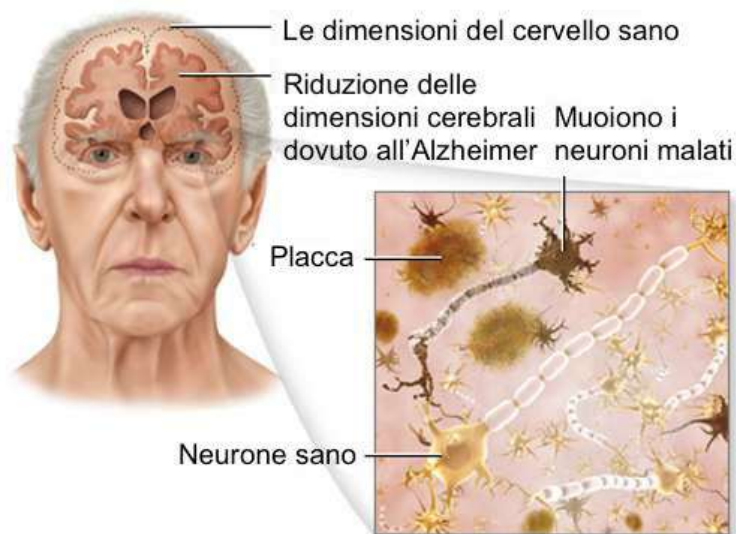


Figura 3. Caratteristiche della malattia di Alzheimer

I depositi di amiloide sono aggregati di proteina $A\beta$, comprendente 40 o 42 residui di aminoacidi che derivano dal taglio proteolitico della proteina precursore dell'amiloide (amyloid precursor protein, APP) ad opera di enzimi come β -secretasi (o BACE-1) e γ -secretasi (Kang J et al., 1987). $A\beta_{42}$ ha un maggiore tendenza ad aggregarsi rispetto $A\beta_{40}$, inoltre rappresenta la principale protagonista della formazione dell'amiloide. L'enzima γ -secretasi è un complesso enzimatico costituito da quattro proteine: presenilina, nicastrina, PEN2 (presenilin enhancer) e APH1 (anterior pharinx hormone). APP è una proteina di membrana, costituita da 770 aminoacidi espressa in numerose cellule (Small DH, 2009). Viene tagliata dall'enzima β -secretasi, producendo un frammento solubile β -APP (sAPP β) e un frammento β C-terminale (CTF β , C99). C99 verrà a sua volta tagliato dall'enzima γ -secretasi, generando un dominio intracellulare APP (AICD) e $A\beta$.

La proteina APP viene tagliata anche dall'enzima α -secretasi, ottenendo peptidi più piccoli, che sono incapaci a costituire depositi insolubili, (sAPP α) e un frammento α C-terminale (CTF α , C83). C83 verrà a sua volta tagliato dall'enzima γ -secretasi producendo frammenti non tossici (P3 e AICD) (Figura 4) (Xiaojuan S et al., 2015).

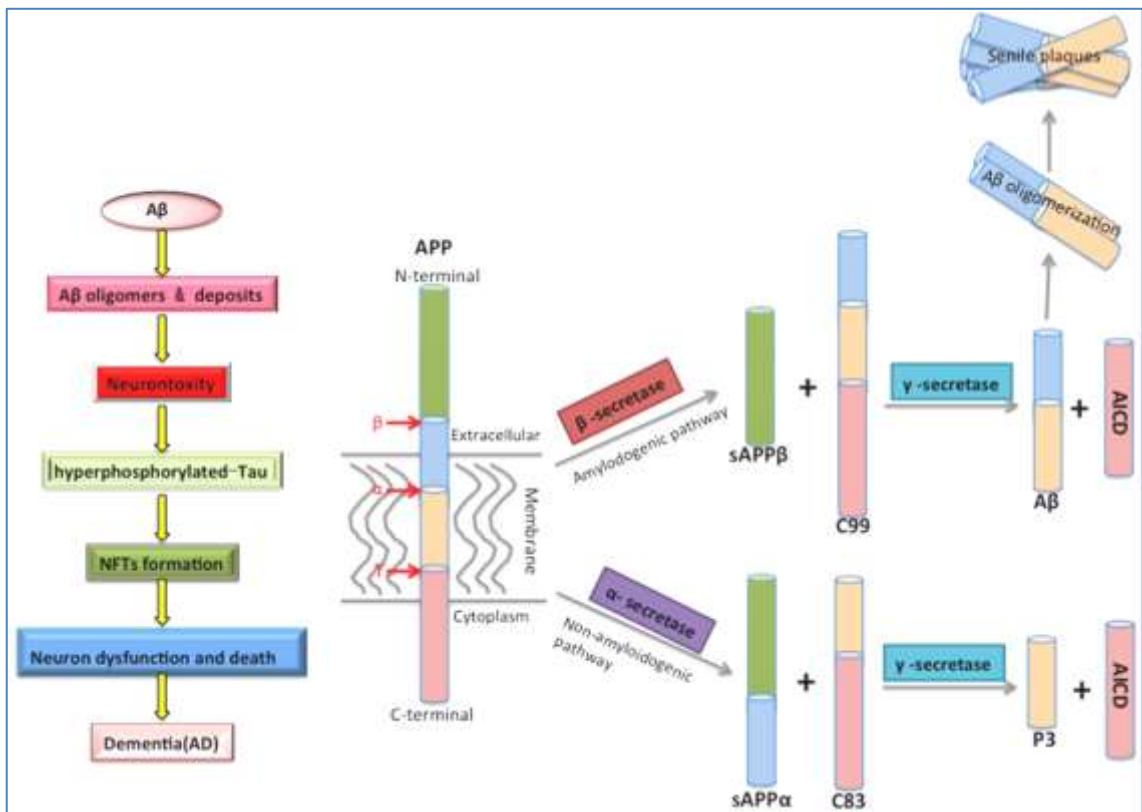


Figura 4. Formazione proteina Aβ.

Un altro protagonista è la proteina Tau, che è un normale costituente dei neuroni associata ai microtubuli. In particolare nell'AD, Tau è fosforilata in maniera anomala e depositata sotto forma di filamenti appaiati ad elica. I gomitoli neurofibrillari sono considerati tipici marker istologici dell'AD e sono anche presenti nei cervelli di pazienti affetti da demenza fronto-temporale.

Terapia della malattia di Alzheimer

Nonostante siano in atto tentativi di sviluppare farmaci che agiscono su A β , Tau o altre molecole coinvolte nella patogenesi, non è ancora disponibile una terapia in grado di modificare il decorso della malattia di Alzheimer. Nei pazienti affetti da AD la concentrazione di acetilcolina a livello delle giunzioni neuronali colinergiche è ridotta, in particolare i terminali dei neuroni colinergici che hanno origine dal nucleo basale di Meynert ed innervano numerose strutture corticali sono notevolmente ridotti, così il potenziamento della trasmissione colinergica rappresenta il trattamento chiave. In fase lieve e moderata, come terapia di prima linea per il trattamento sintomatico, vengono usati gli inibitori dell'acetilcolinesterasi che aumentano la trasmissione colinergica ritardando la degradazione dell'acetilcolina (Godyn J et al., 2016). Altre strategie, come la somministrazione di precursori dell'acetilcolina, non hanno ancora generato risultati clinici dimostrabili. La Tacrina è stato il primo inibitore usato per la terapia di AD. E' capace di migliorare i test della memoria e quelli cognitivi, tuttavia la sua breve durata d'azione, gli effetti collaterali, le interazioni con altri farmaci hanno portato all'abbandono di questa molecola. Attualmente sono tre i farmaci usati (Donepezil, Rivastigmina e Galatamina), migliorano i sintomi cognitivi e comportamentali. I farmaci sono ben tollerati e gli effetti collaterali più comuni sono crampi muscolari, nausea, dolore gastrointestinale, perdita di peso, alterazione del sonno, vertigini e sudorazione. Lo svantaggio derivante dall'uso di questi farmaci dipende dalla scarsa selettività nei confronti di specifici recettori e dalla progressiva diminuzione di efficacia. Donepezil è il farmaco di primo impiego per migliorare la memoria e rallentare l'evoluzione della malattia, inibisce in maniera reversibile le colinesterasi, a differenza della Rivastigmina che inattiva le colinesterasi in maniera pseudo irreversibile attraverso un processo di carbamilazione. Inoltre, la Rivastigmina inibisce preferenzialmente gli enzimi situati nella corteccia e nell'ippocampo, avendo una buona selettività per le acetilcolinesterasi, quindi gli effetti collaterali sono minori.

La Galatamina, a differenza degli altri inibitori delle esterasi, stimola anche i recettori nicotinici e favorisce la liberazione di acetilcolina dai terminali nervosi.

Un'ulteriore molecola, la Memantina, viene usata per rallentare la progressione della malattia di grado moderato o grave, in quanto capace di ridurre la tossicità degli amino

acidi eccitatori e di prevenire gli eventi eccitotossici antagonizzando i recettori NMDA. La Memantina può essere associata a Donepezil in quanto ben tollerata. Gli effetti collaterali comprendono allucinazioni, confusione mentale, affaticamento. E' controindicato l'uso concomitante con altri antagonisti dell'NMDA.

E' in atto lo sviluppo di nuovi farmaci per AD come gli agonisti dei recettori muscarinici M1, coinvolti nella memoria e nell'apprendimento; gli agonisti dei recettori nicotinici di tipo $\alpha 7$, predominanti nelle aree in cui è coinvolta la degenerazione colinergica; gli anticorpi monoclonali anti β -amiloide; gli inibitori delle secretasi ed i composti che agiscono sulla proteina tau. Alcuni studi scientifici hanno dimostrato che la stimolazione dei recettori muscarinici di tipo M1, localizzati nell'ippocampo e nella corteccia, possa rallentare la progressione della malattia, riducendo i livelli di $A\beta$. Tra i composti attualmente in fase di sperimentazione è possibile distinguere AF102B e Talasaciclidina. Ulteriori ricerche si sono concentrate sull'attività degli agonisti del recettore nicotinico di tipo $\alpha 7$, rilevando che la stimolazione di questi recettori protegge le cellule dalla degenerazione indotta da $A\beta$. Ha destato particolare interesse il composto ABT-107 in quanto ha generato miglioramenti di tipo cognitivo nei ratti, topi e scimmie.

Sono stati identificati alcuni inibitori delle β -secretasi e γ -secretasi, però la γ -secretasi presenta un ruolo anche in altre cascate di trasduzione del segnale quindi potrebbe indurre numerosi effetti collaterali. Attualmente nessuna molecola capace di inibire l'enzima β -secretasi è in sperimentazione clinica, nonostante questo enzima è essenziale per la produzione di amiloide $\beta 1-42$ (Becker RE et al., 2008).

TRAIL e i suoi recettori

Nel 1995 e nel 1996, indipendentemente l'uno dall'altro, Wiley e Pitti hanno scoperto una proteina in grado di indurre rapidamente apoptosi. Questa proteina è stata nominata TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) o Apo2L per l'alta omologia con altri membri della famiglia del TNF e per la stretta relazione con Fas/Apo-1 ligand (Pitti et al., 1996), (Wiley et al., 1995). E' costituita da 281 e 291 aminoacidi, rispettivamente, nell'uomo e nel topo con massa molecolare circa 33-35 kDa (Sanchez-Nino MD et al., 2010). TRAIL è una proteina transmembrana di tipo II con un corto dominio N-terminale e un lungo dominio extracellulare C-terminale, responsabile del legame con il recettore. Nell'uomo, TRAIL lega cinque differenti recettori, codificati da diversi geni con alta omologia di sequenza nel dominio extracellulare. Diversi studi hanno dimostrato la capacità di TRAIL ad innescare l'apoptosi attraverso il legame con i recettori TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5), entrambi presentano il "death domain" (DD) (LeBlanc and Ashkenazi, 2003). Inoltre, TRAIL si lega ad altri recettori che agiscono come "decoys". I recettori TRAIL-R3 (DcR1) e TRAIL-R4 (DcR2) sono recettori di membrana. In particolare, DcR1 non presenta un dominio citoplasmatico, mentre DcR2 ha un dominio di morte (DD) troncato, quindi incapace di indurre morte cellulare. Così questi recettori non possono innescare l'apoptosi in seguito al legame con TRAIL e quindi ne inibiscono l'attività. Il quinto recettore, osteoprotegerina (OPG), si lega con bassa affinità (Figura 5) (Gaur et al, 2003). OPG inibisce l'attività degli osteoclasti, indotta dall'attivatore del recettore del ligando di NF- κ B (RANKL) (Held e Schulze-Osthoff, 2001).

La forma biologicamente attiva di TRAIL è un omotrimerico, un monomero della proteina presenta due foglietti β piegati antiparalleli che interagiscono con le subunità vicine per formare un omotrimerico a forma di campana (Almasan A e Ashkenazi A, 2003). Essenziale per l'attività biologica e per la stabilità è l'atomo di zinco, coordinato da un residuo di cisteina (Hymowitz et al., 2000).

I recettori DR4 e DR5 possono attivare una via di morte cellulare o una via di sopravvivenza attraverso il coinvolgimento di fattori di trascrizione differenti. TRAIL innesca l'apoptosi attraverso il legame con i recettori DR4 o DR5, determinando la formazione del complesso per l'induzione del segnale di morte (DISC) (Walczak H e

Haas TL, 2008). Questo rappresenta il primo passo di induzione di morte programmata, inizia con l'ancoraggio di FADD (Fas-associated death domain) ai domini di morte dei recettori di TRAIL attivati. In seguito il dominio di morte della proteina FADD (DED) recluta la procaspasi 8 e la procaspasi 10 che vengono attivate e rilasciate nel citosol. La caspasi 8 recluta le caspasi effettrici, come caspasi 3, 6 e 7, dando il via al segnale di morte (Kimberley FC e Screaton GR, 2004). Questo sistema rappresenta la via estrinseca che porta all'attivazione dell'apoptosi. La risposta a TRAIL può manifestarsi attraverso due modalità distinte, la via estrinseca e la via intrinseca (Huang et al, 2005). La via apoptotica intrinseca è messa in moto per mezzo di segnali differenti, che danneggiano i mitocondri. Questa via è caratterizzata dalla traslocazione di membri proapoptotici della famiglia Bcl-2 ai mitocondri (Bax e Bak), con conseguente perdita del potenziale transmembrana. Questo induce rilascio nel citosol di citocromo C (cytoc) e di altri fattori mitocondriali (Duiker et al, 2006). Nel citosol, il citocromo C si complessa con il fattore Apaf-1 per attivare la caspasi 9, con conseguente attivazione delle caspasi effettrici 3, 6 e 7 (Falschlehner et al, 2009). Diverse proteine chinasi come MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) e p38, insieme al fattore di trascrizione NF- κ B, sono in grado di regolare la via apoptotica attivata da TRAIL (Bhardwaj et al, 2003). Oltre l'apoptosi, risultati *in vitro* e *in vivo* hanno mostrato che TRAIL può indurre morte cellulare attraverso altri meccanismi, come la necrosi (Guo et al, 2005; Voigt et al, 2014).

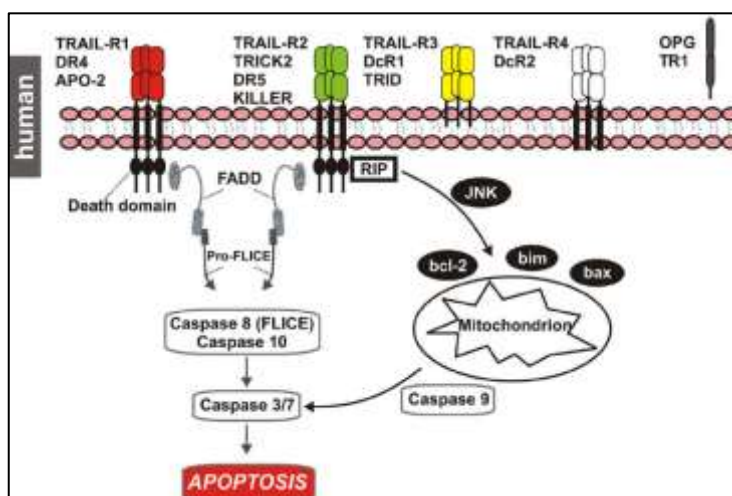


Figura 5. Recettori TRAIL.

TRAIL nella neurodegenerazione

Alcuni studi dimostrano che nel cervello sano sono presenti livelli molto bassi di TRAIL e in particolare gli oligodendrociti e neuroni esprimono in abbondanza recettori decoy e pochi recettori di morte (Cannella et al., 2007). La presenza di recettori di morte nelle cellule parenchimali del cervello suggerisce un potenziale ruolo della citochina TRAIL come mediatore di apoptosi a livello neuronale e gliale (Dörr et al., 2002). In condizioni patologiche, come sclerosi multipla (Cannella et al., 2007) o morbo di Alzheimer (Uberti et al., 2004), TRAIL e i suoi recettori sono regolati in modo diverso. In particolare, TRAIL svolge un ruolo centrale nei processi neuroinfiammatori. E' dimostrato che TRAIL favorisce l'aumento dell'espressione di molecole infiammatorie, come FasL (Fas Ligand) e dei suoi recettori di morte (Cantarella et al., 2010).

Gli effetti di TRAIL su neuroni in neurodegenerazione, sono stati scoperti nel 2003 da Cantarella et al. (Cantarella et al. 2003). Hanno dimostrato che cellule SH-SY5Y differenziate di neuroblastoma umano, trattate con A β , mostrano un'elevata presenza di TRAIL e dei suoi recettori di morte DR4 e DR5. In particolare, il frammento A β favorisce la trascrizione, la sintesi proteica e il rilascio di TRAIL nel mezzo di coltura. Così, la citochina TRAIL contribuisce alla neurotossicità indotta da A β . (Cantarella G et al., 2003). Ulteriori esperimenti hanno evidenziato che TRAIL mette in moto la macchina apoptotica attraverso l'attivazione delle via estrinseca delle caspasi. Infatti, attraverso il silenziamento della proteina FADD, viene favorita la protezione delle cellule dal danno o morte cellulare indotto da A β . Questi risultati si ottengono anche con l'uso degli inibitori delle caspasi. Questo suggerisce che TRAIL promuove il processo neurodegenerativo.

Inoltre, successivi esperimenti in vitro hanno portato alla luce che neutralizzando TRAIL attraverso uno specifico anticorpo monoclonale, anti-TRAIL, in cellule differenziate di neuroblastoma trattate con A β si ottiene una riduzione di morte pari al 70-80% circa. L'idea, che TRAIL funge da mediatore di morte cellulare e neuroinfiammazione, è stata confermata da dati ottenuti da studi post mortem in cervelli umano affetti da AD (Uberti et al., 2004).

Ulteriori esperimenti hanno dimostrato che il trattamento con TRAIL favorisce la fosforilazione di JNK, di ERK1/2 e della p-38 in relazione al suo tempo di incubazione. I membri della famiglia delle MAP chinasi sono coinvolti in una vasta gamma di risposte cellulari e sono attivati da diversi fattori, come le molecole proinfiammatorie (Cantarella et al., 2007).

Lo scambiatore sodio – calcio (NCX)

Il calcio è uno ione di fondamentale importanza in numerosi processi cellulari, partecipa al meccanismo di contrazione muscolare e attivazione neuronale, alla secrezione di ormoni e funge da “cofattore” in reazioni enzimatiche. Grazie all’azione simultanea di diversi sistemi che consentono l’influsso e/ o l’efflusso, la concentrazione citosolica $[Ca^{2+}]_c$ è ~ 100 nmol/L, mentre la concentrazione extracellulare è ~ 1 mmol/L. L’omeostasi del Ca^{2+} è regolata da meccanismi che si attivano in base alla necessità della cellula di incrementare o di ridurre la concentrazione di Ca^{2+} nel citosol. Alterazioni nella funzione di questi sistemi potrebbero avere gravi effetti che, spesso, sono associati alla patogenesi di malattie (Lorenzon and Beam, 2000). La concentrazione di Ca^{2+} viene mantenuta costante grazie alla attivazione di diversi sistemi come canale voltaggio dipendenti, recettori di canale, scambiatore Na^+/Ca^{2+} , pompa Ca^{2+} ATPasi, legame a proteine intracellulari, legame a ioni e meccanismo di sequestro all’interno di organelli come il reticolo endoplasmatico e mitocondri (Berridge et al., 2000). Il reticolo endoplasmatico rappresenta una grande riserva di Ca^{2+} ed è in grado rilasciarlo in risposta a specifici segnali. L’efflusso di Ca^{2+} dal citosol cellulare verso l’ambiente extracellulare, è mediato dallo scambiatore Na^+/Ca^{2+} (NCX) (Philipson and Nicoll, 2000), (Bers, 2002).

La famiglia dei geni SLC (*solute carrier*) 8 codifica per gli scambiatori Na^+/Ca^{2+} (NCX). Nei mammiferi sono state identificati tre differenti geni, in particolare il gene SLC8A1 codifica NCX1 (Nicoll et al., 1990), il gene SLC8A2 codifica NCX2 (Lee et al., 1994) e il gene SLC8A3 codifica NCX3 (Nicoll et al., 1996), (Quednau et al., 1997). NCX1, ampiamente espresso, è abbondante nel cervello, nel cuore e nel rene, NCX2 è espresso principalmente nel cervello e NCX3 è presente nel cervello e nei muscoli scheletrici. Le tre isoforme di NCX, coespresse in varie aree cerebrali, svolgono ruoli differenti (Minelli et al., 2007), (Canitano et al., 2002). Ad oggi, non è possibile definire con certezza il ruolo fisiopatologico a livello neuronale delle tre isoforme di NCX (Jeffs et al., 2007). Sembra che NCX1 abbia una prevalente espressione nei corpi cellulari e nelle proiezioni dendritiche neuronali, mentre NCX2 mostra un’alta espressione gliale e NCX3 ha una localizzazione neuronale più specifica. Di recente è stato dimostrato che la localizzazione di NCX1, NCX2 e NCX3 non è soltanto confinata a livello della

membrana plasmatica, ma include anche compartimenti intracellulari come i mitocondri (Minelli et al., 2007). In particolare, nel cervello lo scambiatore NCX2 ha espressione mitocondriale molto elevata in astrociti e neuroni, NCX3 ha un'espressione prevalente mitocondriale neuronale, mentre NCX1 è localizzato preferenziale nei mitocondri ippocampali (Minelli et al., 2007). A livello mitocondriale è stato rilevato anche uno scambiatore sodio-calcio la cui espressione sembra ristretta a questi organelli cellulari (NCX_{mito}). NCX_{mito} è localizzato a livello della membrana mitocondriale interna dei neuroni e di altre cellule eccitabili (referenza di NCLX Palty et al., 2010). Regolando l'efflusso di ioni Ca²⁺ dalla matrice mitocondriale, NCX e NCX_{mito} influenzano sia l'omeostasi del Ca²⁺ citoplasmatico sia mitocondriale.

Esistono varianti di splicing derivanti dalla combinazione di 6 piccoli esoni (A, B, C, D, E, e F), localizzati in una piccola porzione dell'f-loop: 17 varianti per NCX1; 5 varianti per NCX3; per NCX2 non ne sono state ancora identificate (Lytton, 2007). Inoltre, tutte le varianti di splicing includono l'esone A o B, in particolare i tessuti eccitabili contengono l'esone A, come cuore, cervello, muscolatura scheletrica, mentre le cellule non eccitabili, come rene, fegato, polmoni, contengono l'esone B (Quednau et al., 1997). Le tre isoforme della proteina NCX mostrano la stessa topologia di membrana che prevede un'organizzazione di membrana a 10 segmenti ad α -elica (TMS1-10) (Figura 6), suddiviso in tre domini principali: due cluster idrofobici, uno N-terminale comprendente i primi 5 tratti transmembrana e uno C-terminale comprendente gli ultimi 5 segmenti trans membrana, separati da una regione idrofilica intracellulare, chiamata f-loop (ansaf).

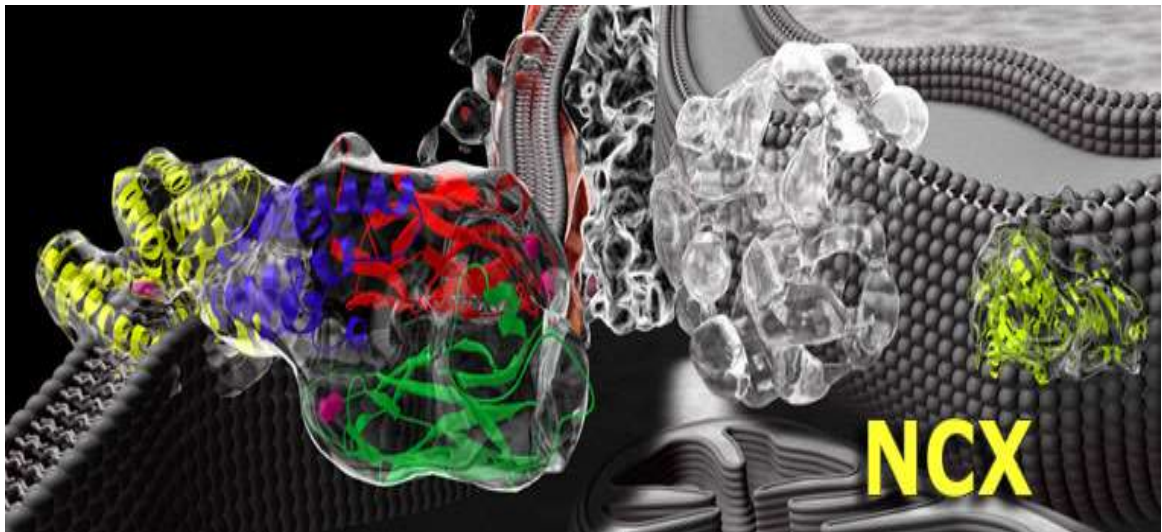
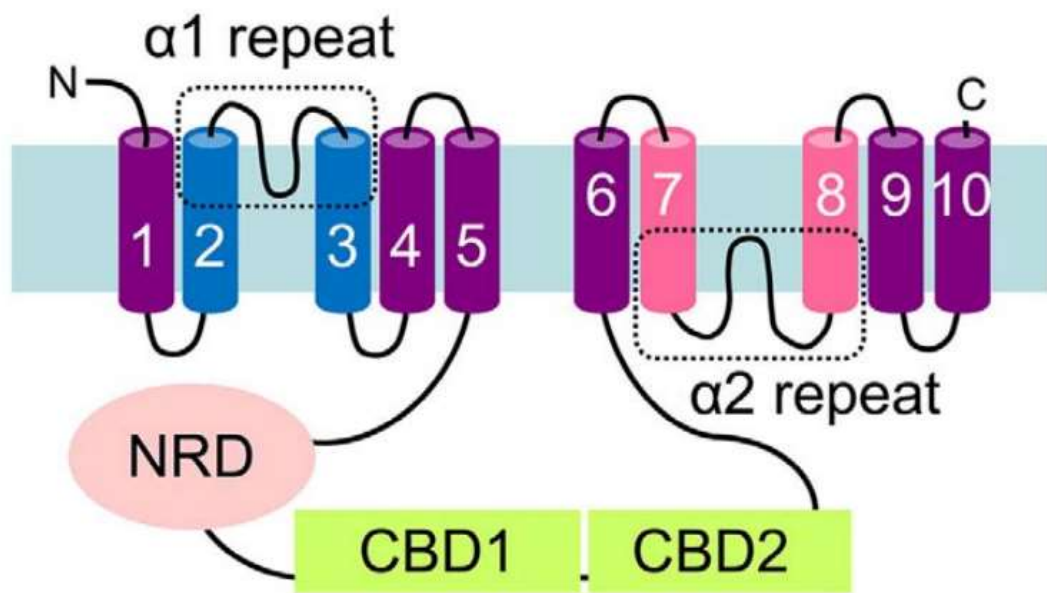


Figura 6. Topologia e probabile ripiegamento membranario di NCX.

La porzione N-terminale è esposta extracellularmente mentre quella C-terminale è intracellulare (Lytton, 2007). Inoltre, contengono due sequenze amminoacidiche ripetute conosciute come α -repeat, orientate in direzione opposte rispetto alla membrana plasmatica (Nicoll et al., 1996), le loro regioni centrali formano loop rientranti in membrana, andando a costituire i domini di legame e trasporto del Na^+ e Ca^{2+} (Lytton, 2007). Nell'f-loop citoplasmatico sono state individuate due importanti regioni: la prima localizzata nella porzione N-terminale, costituita da una sequenza contenente circa 20 residui di natura idrofobica o basica, chiamata XIP (exchanger inhibitory peptide) (Li et al., 1991); la seconda comprende due sequenze ripetute in tandem originariamente chiamate β -repeats, oggi definite CBD (Ca binding domain) 1 e 2 (Nicoll et al., 2006). CBD1 lega quattro ioni Ca^{2+} con alta affinità, in seguito a questo legame si verifica un cambio conformazionale responsabile probabilmente dell'azione regolatoria del Ca^{2+} su NCX. CBD2 lega ioni Ca^{2+} con affinità inferiore e non si verificano cambiamenti conformazionali in seguito al legame. Mutazione all'interno di CBD1 diminuisce l'apparente affinità di NCX per il Ca^{2+} nella sua funzione regolatoria (Matsuoka et al., 1995) mentre perturbazione dei siti primari di legame per il Ca^{2+} in CBD2 rimuove completamente la regolazione da parte del Ca^{2+} (Besserer et al., 2007).

Regolazione dell'attività di NCX

NCX può scambiare reversibilmente uno ione calcio per tre ioni sodio in base al gradiente elettrochimico degli ioni trasportati e al potenziale di membrana (Philipson and Nicoll, 2000). In particolare, sono state descritte le seguenti modalità di scambio:

- *forward mode*, responsabile dell'efflusso di Ca^{2+} . Si verifica quando le $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumentano, così NCX accoppia all'estrusione di ioni Ca^{2+} l'ingresso di ioni Na^+ nella cellula, (Torok, 2007).
- *reverse mode*, responsabile dell'influsso di Ca^{2+} (Figura 7);
- scambio omologo e non elettrogenico di Ca^{2+} o di Na^+ ;
- "Na-conducting mode", dove uno ione Na^+ e uno ione Ca^{2+} possono essere scambiati per uno ione Ca^{2+} , muovendo una carica netta attraverso la membrana plasmatica (Kang and Hilgemann, 2004).

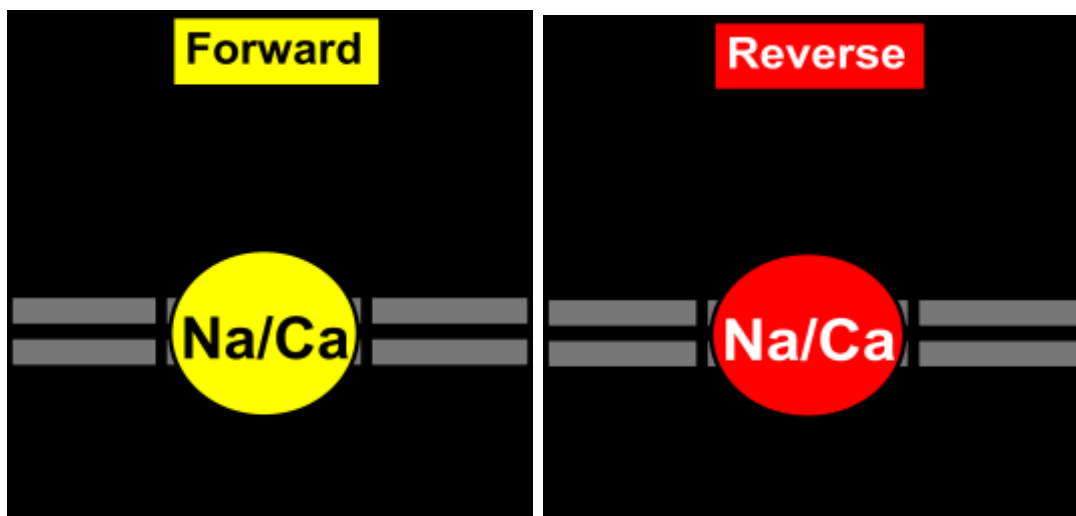


Figura 7. Forward e reverse mode.

La stechiometria generalmente accettata è 3 ioni Na^+ /1 ione Ca^{2+} ; tuttavia è stato dimostrato che il rapporto del flusso ionico può variare ed essere da un minimo di 1:1 ad un massimo di 4:1; in relazione alle concentrazioni intracellulari di ioni Na^+ e Ca^{2+} (Kang and Hilgemann, 2004).

Il forward mode e il reverse mode sono modi di operare elettrogenici originando correnti *inward* (entranti o depolarizzanti) per il forward mode o correnti *outward* (uscenti o iperpolarizzanti) per il reverse mode (Torok, 2007) in misurazioni elettrofisiologiche (inserisci una referenza).

Gli ioni Na^+ e Ca^{2+} , oltre ad essere trasportati, svolgono anche funzioni regolatorie, infatti l'attività di NCX è soggetta a complesse regolazioni ioniche e metaboliche. Questi meccanismi regolatori costituiscono insieme il cosiddetto gating di NCX e comprendono: l'inattivazione sodio-dipendente o "I₁", l'inattivazione calcio-dipendente o "I₂", e un'inattivazione profonda chiamata "I₃" che si verifica quando entrambe I₁ e I₂ prendono luogo (Hilgemann, 1996).

Inibizione farmacologica dell'attività di NCX

Diversi studi hanno evidenziato che alcuni composti sono capaci di bloccare o attivare l'attività di NCX. Tuttavia, l'efficacia e la selettività di questi composti sono state messe in discussione (Reuter et al., 2002) (Toth et al., 2009). E' possibile distinguere 3 categorie: inibitori non specifiche; peptidi inibitori; inibitori benzilossi fenilici derivati. Sono inclusi negli inibitori non specifiche: gli ioni divalenti e trivalenti (Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} , La^{3+}), la loro azione può essere associata sia ad un'azione diretta su NCX1 che ad un rimpiazzamento dello ione Ca^{2+} ed i composti antiaritmici, come amiodarone, bepridil, dronedarone. Tra i peptidi inibitori, si distinguono quelli di sintesi (come XIP) e quelli naturali (come NCXIF o FMRF, rispettivamente purificati da bovini o molluschi) (Hiller et al., 2000). I derivati benzilossi fenilici sono gli inibitori più selettivi e sono costituiti da KB-R7943, SEA0400, SN6 e YM-244769.

Ogni membro di questo gruppo di inibitori farmacologici ha una diversa selettività per le isoforme di NCX (Toth et al., 2009). Il KBR-R7934 è più attivo su NCX3 rispetto a NCX1 o NCX2 in quanto interagisce con diverse regioni di proteina. Il SEA0400 blocca prevalentemente NCX1 ed ha scarsi effetti su NCX2 e NCX3. L'SN6 è più attivo su NCX1, mentre l'YM-244769 su NCX3. Vari studi hanno evidenziato come questi composti inibiscano l'attività di NCX soprattutto nelle condizioni che favoriscono il reverse mode dello scambiatore, quindi in presenza di alte concentrazioni di Na^+ e basse concentrazioni di Ca^{2+} . Infatti, la potenza inibitoria di questi composti è direttamente correlata alla velocità dell'inattivazione I_1 , suggerendo che lo scambiatore nello stato inattivo I_1 sia il loro bersaglio preferenziale (Toth et al., 2009).

NCX nella neurodegenerazione

È già dimostrato da più di 20 anni, che i neuroni, non sani, presentano alti livelli di Ca^{2+} (Landfield PW, 1987; 1989). Sulla base di questa osservazione, è stato suggerito che l'alterazione dell'omeostasi di Ca^{2+} può essere alla base della neurodegenerazione (Khachaturian ZS, 1987). Infatti, cambiamenti sull'omeostasi del calcio sono un evento precoce nell'AD, che mediano la disfunzione sinaptica e la neurotossicità (Small DH, 2009), (Li S et al., 2011). Inoltre, il Ca^{2+} è un mediatore chiave nella plasticità sinaptica (Etienne P and Baudry M, 1987), quindi, una sua alterazione può portare ad anomalie cognitive. $\text{A}\beta$ stimola l'afflusso di Ca^{2+} neuronale attraverso recettori o canali ionici (Small DH, 2009), provocando un rapido aumento del contenuto di Ca^{2+} . Nella regolazione del Ca^{2+} intracellulare, lo scambiatore sodio-calcio (NCX) svolge un ruolo importante; infatti, esso è considerato il principale trasportatore che media l'efflusso di Ca^{2+} dal citosol verso l'ambiente extracellulare quando i livelli di Ca^{2+} sono elevati (Lytton L, 2007). Per la sua rilevanza fisiopatologica nel cervello, NCX è stato sottoposto a numerosi studi al fine di identificare i meccanismi che regolano la sua espressione sia in condizioni normali e sia nei modelli di neurodegenerazione (Annunziato et al., 2009). Dati suggeriscono che una ridotta funzione di NCX contribuisce all'effetto neurodegenerativo, favorendo un incremento della concentrazione di Ca^{2+} all'interno dei neuroni, che è associato alla disfunzione sinaptica e neuronale, caratteristica tipica nell'AD (Atherton J et al., 2014).

Inoltre, è riportato in letteratura che NGF (nerve growth factor) provoca un aumento dell'espressione di NCX1 e NCX3 e una riduzione dell'espressione di NCX2 (Formisano et al., 2008).

NFG è un membro della famiglia delle neurotrofine che lega il recettore TrkA ed attiva chinasi come Erk 1/2 e Akt (Sirabella S et al., 2012). Le neurotrofine sono al centro di studi per comprendere il loro ruolo fisiologico e il loro possibile coinvolgimento nella patogenesi di alcune malattie neurodegenerative, come la AD e il PD (Dawbarn D. e Alle S.J., 2003). Queste proteine sono implicate sia nell'organizzazione del sistema nervoso nelle prime fasi del suo sviluppo e sia nelle fasi successive per il controllo della sopravvivenza neuronale. Infatti, le neurotrofine mediano la sopravvivenza, il differenziamento, la crescita e l'apoptosi neuronale attraverso il legame con due

specifici recettori: Trk, recettore appartenente alla famiglia di recettori tirosin-chinasici e p75, membro della superfamiglia di recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF). La fosforilazione del dominio citoplasmatico dei recettori Trk recluta specifiche molecole che fungono da segnale all'interno del neurone, la maggior parte delle quali ha come bersaglio altri recettori tirosin-chinasici. Le principali vie regolate dai recettori Trk sono la PI3K/Akt (fosfatidilinositolo-3-OH-chinasi) e la MAPK/ERK (protein-chinasi attivate da mitogeni) (Kaplan DR e Miller FD., 2000). La via PI3K/Akt rappresenta uno dei principali meccanismi coinvolti nella sopravvivenza neuronale. La proteina Akt controlla la sopravvivenza, l'apoptosi, la proliferazione cellulare ed il metabolismo del glucosio. Essa viene attivata in risposta a differenti stimoli cellulari, includendo fattori di crescita, ormoni e stress extracellulari. Un target dell'Akt è la proteina Bad, un membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2, che nella sua forma non fosforilata può legare la proteina Bcl-xL ed indurre apoptosi. L'attivazione di Akt determina la fosforilazione di Bad nel residuo Ser136, così, rimanendo sequestrato a livello citoplasmatico, viene inibita la sua azione pro-apoptotica (Yuan J e Yankner BA, 2000). Un altro substrato della proteina Akt è la pro-caspasi-9, che è la forma inattiva di uno dei principali esecutori del programma apoptotico. Akt blocca il programma di morte cellulare inibendo la proteolisi e quindi l'attivazione della pro-caspasi-9 (Kaplan DR e Miller FD., 2000).

Un ulteriore via è costituita dalla MAPK/ERK (protein-chinasi attivate da mitogeni). Viene attivata da un ampio numero di stimoli extracellulari ed intracellulari e partecipa a numerosi processi come la proliferazione, il differenziamento, lo sviluppo, la sopravvivenza cellulare e l'apoptosi. L'attivazione di ERK comporta la fosforilazione di di fattori nel citosol e nel nucleo, come fattori di trascrizione o le chinasi effettrici (Shaul YD e Seger R, 2007).

SCOPO DEL LAVORO

Nonostante numerosi fattori siano stati indicati come mediatori della patogenesi di AD, è possibile attribuire un ruolo cruciale alla proteina A β , abbondantemente prodotta e depositata in placche senili con notevole attività neurotossica (Selkoe DJ, 2000).

Nella linea cellulare SH-SY5Y, il frammento A β provoca apoptosi con incremento del rilascio di TRAIL (Cantarella G et al., 2003). La citochina TRAIL induce potenti effetti proapoptotici in diverse linee cellulari tumorali (Wiley SR et al., 1995).

Inoltre, la proteina A β stimola l'afflusso di Ca²⁺ neuronale (Small DH, 2009), provocando un rapido aumento del contenuto di Ca²⁺. Nella regolazione del Ca²⁺ intracellulare, lo scambiatore sodio-calcio (NCX) svolge un ruolo pilota (Lytton L, 2007).

Alla luce di queste considerazioni, nel presente lavoro è stata studiata la possibile alterazione della funzione dello scambiatore NCX in presenza della citochina proapoptotica TRAIL. A tal fine, nella linea cellulare umana di neuroblastoma differenziato, SH-SY5Y, è stato analizzato il coinvolgimento dello scambiatore NCX3 attraverso:

- analisi proteica di Western Blotting;
- determinazione della vitalità cellulare, mediante saggio MTT;
- incorporazione di propidio ioduro-fluoresceina diacetato, al fine di valutare gli effetti citotossici;
- misurazione dell'attività dello scambiatore NCX.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati effettuati su cellule di neuroblastoma umano della linea cellulare SH-SY5Y. Le cellule sono state cresciute in dish da 100nm x20nm, nel mezzo di coltura 1:1 Ham's F12 : Dulbecco's modified Eagle's medium (MEM) contenente 10% (v/v) di fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 50 µg/mL penicillin e 100 µg/mL streptomycin. Le cellule sono mantenute all'interno dell'incubatore ad una temperatura di 37°C e in un'atmosfera di CO₂ al 5%. Sono state utilizzate ad un passaggio compreso tra 25 e 35. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2/3 giorni e il passaggio delle cellule viene effettuato ogni 5/6 giorni. Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato utilizzando piastre multipozzetto. Per la conduzione degli esperimenti di vitalità mediante propidio ioduro - fluoresceina, le cellule sono state piastrate su vetrini sterili, non trattati.

Per la differenziazione le cellule sono state trattate per una settimana con acido retinoico 10 µM.

Sostanze e reagenti

Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA): TRAIL, caspase 8 inhibitor z-IETD-FMK e caspase family inhibitor z-VAD-FMK.

Alomone Labs, Ltd (Jerusalem, Israel): NGF (recombinant human nerve growth factor-beta).

Sigma: Acido retinoico; Dimetil sulfossido biotechnology performance certified (DMSO); Phosphate Bufferd Saline 10x (PBS); Fluoresceina diacetato (FDA).

Calbiochem., San Diego, CA, U.S.A. Propidio Ioduro (PI).

Analisi di Western Blotting

L'espressione delle proteine è stata valutata impiegando metodiche di SDS-PAGE e procedure standard di Western Blotting. Questa metodica consente di separare proteine di diverso peso molecolare mediante la migrazione attraverso le maglie di un gel di poliacrilamide sotto l'azione di un campo elettrico. Dopo trattamento, le cellule SH-

SY5Y vengono lavate con PBS e trattate con 80µl di cocktail costituito da 960µl di Lysis Buffer (contenete 50mM Tris, pH7.6, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 0.5 µg/µl leupeptin, 5 µg/µl aprotinin e 1µg/ml pepstatin) e da 40 µl di inibitore delle protease. I lisati vengono raccolti e trasferiti in una eppendorf, successivamente messi sotto agitazione in una ruota per 20 min e centrifugati per 10 minuti a 15000 *x g* a 4°C. La determinazione del contenuto proteico dei campioni è stata condotta secondo il metodo Bradford (Bradford, 1976), usando l'albumina sierica bovina (BSA) come standard. Alle proteine cellulari (30 µg) è stato aggiunto un volume equivalente di SDS loading buffer (20% glycerol, 100mM Tris-HCl, pH 6.8, 200mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue), i campioni sono bolliti per 5 min e analizzati mediante SDS-PAGE (poliacrilammide tra 8% e 12%). Le proteine così separate sono state trasferite dal gel di poliacrilamide ad una membrana di nitrocellulosa Hybond ECL (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK). Le membrane sono bloccate per un'ora con latte in polvere privo di grassi sciolto in PBS al 5% a temperatura ambiente ed incubate a 4°C *overnight* con l'anticorpo primario (anticorpo rabbit anti-NCX3 (Swant), o anticorpo rabbit anti-TrkA (Santa Cruz Biotechnology, INC), o anticorpo mouse anti-p-TrkA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), o anticorpo rabbit anti-p-AKT (Cell Signaling Technology), o anticorpo rabbit anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology), o anticorpo rabbit anti-p-ERK1/2 (Cell Signaling Technology), o anticorpo rabbit anti-NGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). La β-tubulina è stata usata come controllo interno per convalidare la quantità di proteine caricate in gel (Santa Cruz Biotechnology). Successivamente le membrane sono state lavate 3 volte per 10 minuti in PBS-T e incubate su una piastra agitante per un'ora a temperatura ambiente con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi (diluizione 1:1000). Per l'immunolocalizzazione è stato usato un kit di chemiluminescenza (Luminata Crescendo Western HPR Substrate, Millipore).

Test di vitalità (MTT test)

Per valutare la vitalità è stato utilizzato il test dei Sali di tetrazolio (MTT 3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide). Questo test è un saggio

colorimetrico standard. Il bromuro di metiltiazolildifenil-tetrazolio (MTT) è un sale di tetrazolio che attraversa la membrana plasmatica e viene convertito dalle deidrogenasi mitocondriali di cellule metabolicamente attive in un composto insolubile di colore viola (formazano). Le cellule morte non sono in grado di effettuare tale conversione.

La piastra da 96-well con una densità cellulare di 5×10^3 cellule per well è stata trattata con 10 μ l di MTT. Dopo 1h di incubazione a 37°C vengono aggiunti 100 μ l di DMSO per well. Così, il formazano prodotto, indice di vitalità, è stato solubilizzato con DMSO. L'assorbanza, direttamente proporzionale alla vitalità cellulare, è stata letta allo spettrofotometro a 570 nm.

Saggio incorporazione di propidio ioduro-fluoresceina diacetato.

Il propidio ioduro (PI) viene escluso dalle cellule la cui membrana plasmatica è integra, mentre diventa intensamente fluorescente (rosso) quando si lega ad acidi nucleici in seguito a penetrazione in cellule danneggiate. La fluoresceina-diacetato (FDA) attraversa la membrana e viene idrolizzata da esterasi intracellulari per produrre una fluorescenza giallo-verde. Tale fluorescenza indica che le cellule sono vitali.

Dopo le procedure sperimentali, le cellule SH-SY5Y sono state lavate con un tampone standard e colorate con una soluzione contenete 36 mM di fluoresceina diacetato (FDA) (Sigma, Italy) e 7 mM di propidio ioduro (PI) (Calbiochem., San Diego, CA, U.S.A.). L'incorporazione di PI-FDA è stata quantificata mediante osservazione al microscopio a fluorescenza.

Misurazione dell'attività dello scambiatore NCX in seguito a trattamento con TRAIL.

Per misurare l'attività dello scambiatore NCX3 è stato usato il microscopio confocale Zeiss LSM 510 Meta ed il probe fluorescente per il Ca^{2+} intracellulare FLUO-4 acetossimetilestere (FLUO-4 AM) (Calbiochem, San Diego, CA). Grazie alla presenza del gruppo acetometil estere (AM), l'indicatore può attraversare la membrana plasmatica e, successivamente, subire l'idrolisi del legame esterico ad opera delle esterasi citoplasmatiche. Così, l'indicatore viene compartimentalizzato all'interno del citoplasma cellulare. La lunghezza d'onda di emissione del laser utilizzata per gli

esperimenti è 543 nm. Tutte le immagini sono state ottenute utilizzando il software LSM (Carl Zeiss, Arese, Italia). Le cellule, differenziate, di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state piastrate su vetrini sterili. Trattate per 45 minuti a 37°C al buio con 3µM FLUO-4 AM. In seguito, i vetrini sono stati lavati mediante incubazione di 10 min di una soluzione salina (140mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 10 mM Glucosio, 20 mM HEPES, pH 7.1 aggiustato con 1 M NaOH). L'esperimento viene effettuato in perfusione con una soluzione costituita da 140 mM NaCl, 0 CaCl₂, 0.1 mM EGTA. A circa 60 secondi dalla registrazione del basale, la soluzione di partenza è stata sostituita con un'altra simile, la cui composizione si differenzia unicamente per l'aggiunta di Carbacolo 10 mM. Il Carbacolo favorisce il rilascio di Ca²⁺ dai depositi, così si può valutare un aumento del Ca²⁺ citosolico. Successivamente il Ca²⁺ viene eliminato dal citosol attraverso vari meccanismi, e lo scambiatore NCX, nella modalità *forward*, svolge un ruolo chiave.

Successivamente, è stato ripetuto l'esperimento. Si usa una soluzione salina, costituita da LiCl (140mM LiCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 10 mM Glucosio, 20 mM HEPES), in modo da stimolare l'attività *reverse* dello scambiatore sodio/calcio. Le immagini sono state ottenute prima e dopo la stimolazione con la soluzione Na-free. Per l'analisi dei dati, la fluorescenza è stata espressa in funzione della differenza della risposta dello scambiatore alla soluzione contenente Na⁺ e alla soluzione Na-free.

Analisi statistica dei dati

Gli esperimenti sono stati ripetuti almeno 3 volte ciascuno. La significatività dei dati è stata analizzata mediante analisi della varianza ad una via (*one way ANOVA*) e mostrati attraverso il Fisher's LSD test. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

Questo studio è stato effettuato usando cellule di neuroblastoma umano della linea cellulare SH-SY5Y, differenziate in cellule neuronali dopo trattamento con acido retinoico per sette giorni (Pahlman S et al., 1984), (Uberti D et al., 1997). Le immagini riportate in Figura 8 e 9 mostrano i tipici cambiamenti morfologici di queste cellule prima e dopo trattamento con acido retinoico.

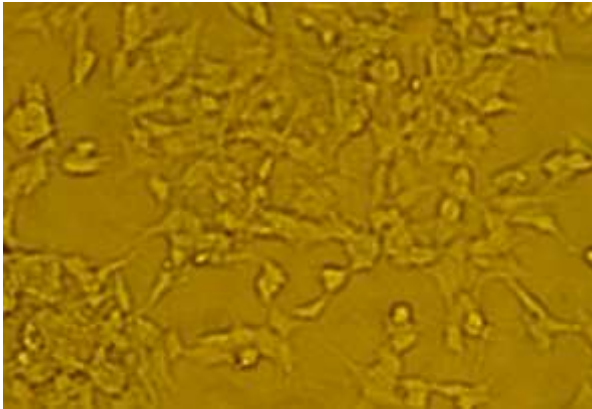


Figura 8. Cellule di neuroblastoma umano della linea cellulare SH-SY5Y

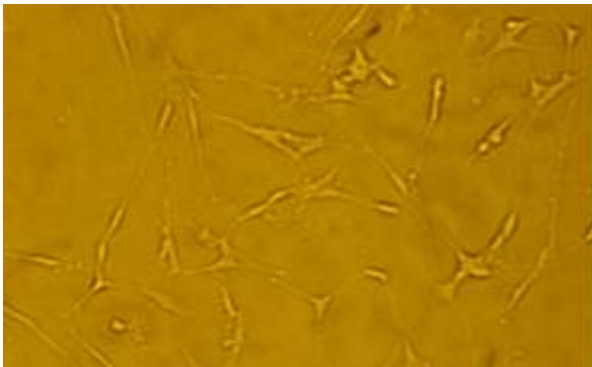


Figura 9. Cellule differenziate di neuroblastoma umano della linea cellulare SH-SY5Y

Espressione della proteina NCX3 è modulata da TRAIL e NGF.

Al fine di identificare l'espressione di una determinata proteina da una miscela, è stata effettuata la tecnica del Western Blotting. Questa tecnica viene utilizzata allo scopo di separare proteine in base al peso molecolare, in seguito trasferite in un supporto di nitrocellulosa nel quale sarà possibile la reazione della proteina di interesse con l'anticorpo specifico. È stata studiata l'espressione della proteina NCX3 con un anticorpo specifico che individua la proteina a circa 110 kDa attraverso la preparazione di lisati cellulari, dopo trattamento con TRAIL e NGF.

Le cellule SH-SY5Y, dopo differenziamento, sono state incubate fino a 48h con TRAIL e NGF. Sono stati creati tre gruppi, così suddivisi: -trattamento con TRAIL in quattro tempi differenti; -trattamento con NGF in quattro tempi differenti; -pretrattamento di un'ora con NGF e successivo trattamento con TRAIL in quattro tempi differenti. L'espressione di NCX3 è stata valutata dopo 6 h, 16 h, 24 h e 48 h di trattamento nei rispettivi gruppi sperimentali. I livelli di NCX3 rimangono invariati fino a 48 h di incubazione con NGF, quando si nota una leggera riduzione dell'espressione. Diversamente, l'analisi western blot della proteina NCX3 in cellule trattate con TRAIL mostra che l'espressione è significativamente ridotta già dopo 6 h di trattamento, e viene ulteriormente soppressa a 24 h e 48 h di incubazione con TRAIL. NGF da solo promuove significativamente l'espressione di NCX3 dopo 6-24 h (ma non dopo 48 h) di trattamento, ed è in grado di prevenire completamente la riduzione dell'espressione di NCX3 indotta da TRAIL nello stesso intervallo temporale (Figure 10-11-12-13).

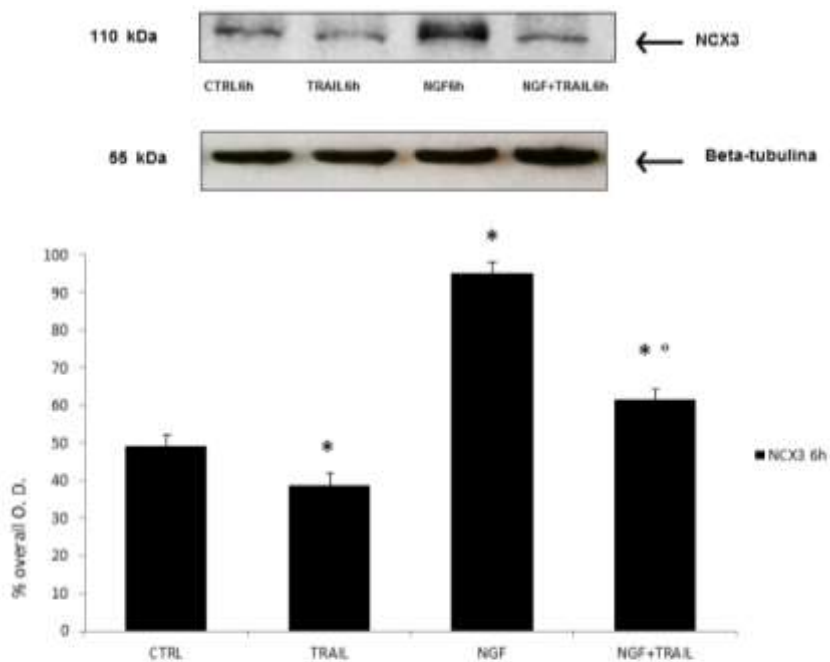


Figure 10. Espressione di NCX3 in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di NCX3 in cellule SH-SY5Y sottoposte a 6 h di trattamento con TRAIL e NGF. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di NCX3 relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL; ** $p < 0.05$ vs TRAIL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

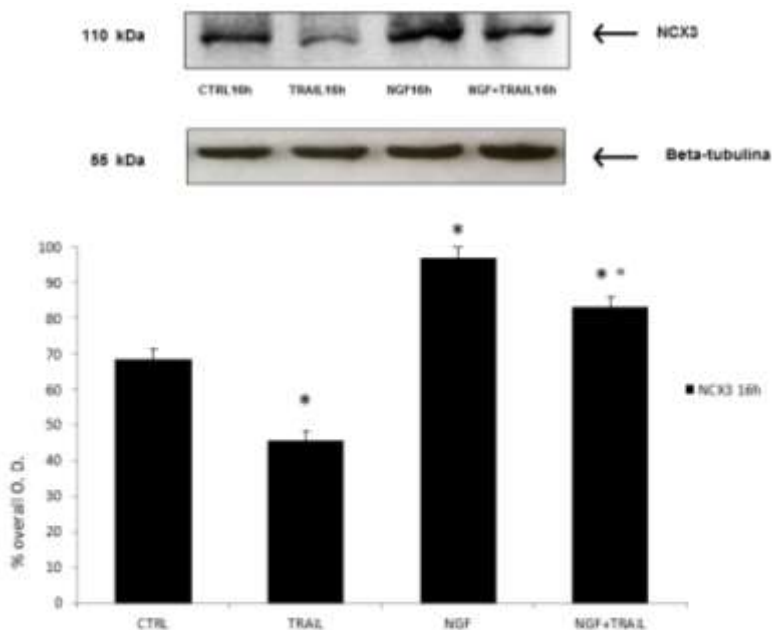


Figure 11. Espressione di NCX3 in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di NCX3 in cellule SH-SY5Y sottoposte a 16 h di trattamento con TRAIL e NGF. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di NCX3 relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL; ** $p < 0.05$ vs TRAIL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

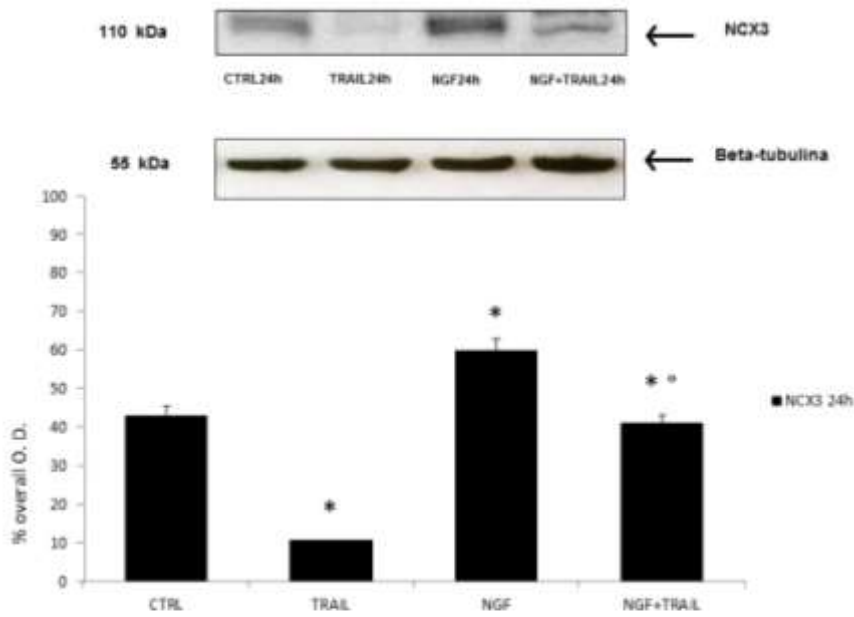


Figure 12. Espressione di NCX3 in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di NCX3 in cellule SH-SY5Y sottoposte a 24 h di trattamento con TRAIL e NGF. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di NCX3 relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL; ** $p < 0.05$ vs TRAIL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

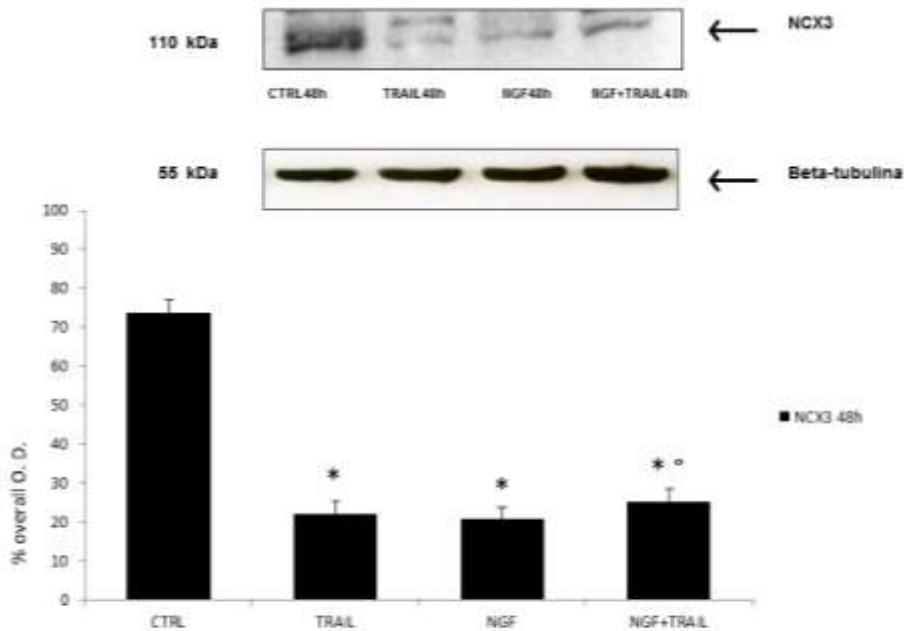


Figure 13. Espressione di NCX3 in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di NCX3 in cellule SH-SY5Y sottoposte a 48 h di trattamento con TRAIL e NGF. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di NCX3 relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL; ** $p < 0.05$ vs TRAIL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

TRAIL modula l'espressione di NGF e la fosforilazione di TrkA ed ERK 1/2.

Ulteriori esperimenti sono stati effettuati per verificare l'espressione di NGF e del suo recettore TrkA. L'espressione di NGF, di TrkA e della sua frazione fosforilata è stata valutata mediante analisi di western blot. In seguito al trattamento delle cellule SH-SY5Y con TRAIL dopo 6 h, 16 h, 24 h, 48 h, l'analisi proteica mostra una notevole attivazione del recettore p-TrkA dopo 16 h di incubazione per poi decrescere, questo è in accordo con l'espressione della proteina NGF, dove si nota un picco di espressione dopo 16 h di incubazione con TRAIL. (Figura 14-15).

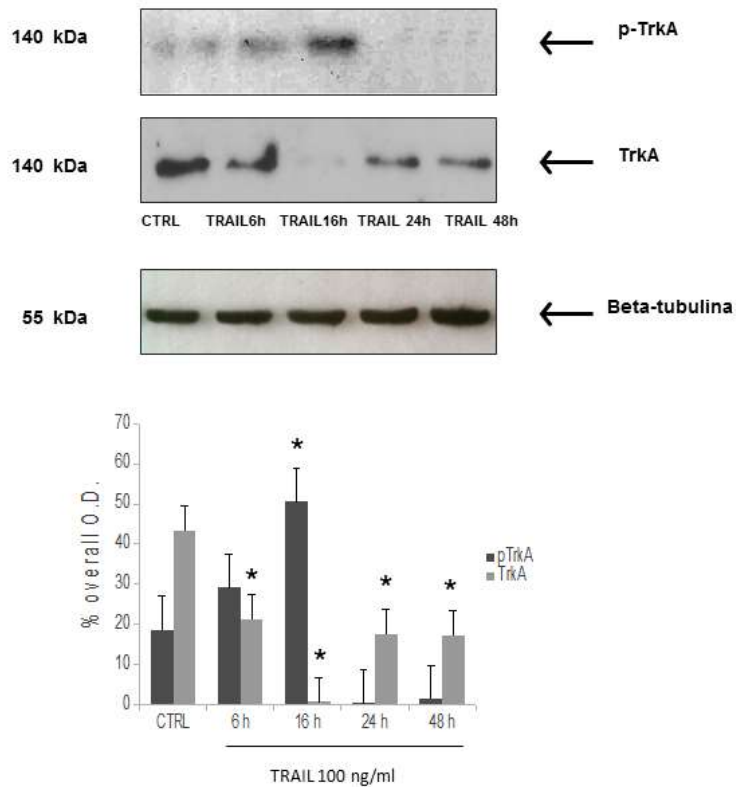


Figure 14. Espressione di p-TrkA e TrkA in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di p-TrkA in cellule SH-SY5Y sottoposte a trattamento con TRAIL. b) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di TrkA in cellule SH-SY5Y sottoposte a trattamento con TRAIL. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. c) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di p-TrkA e TrkA relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

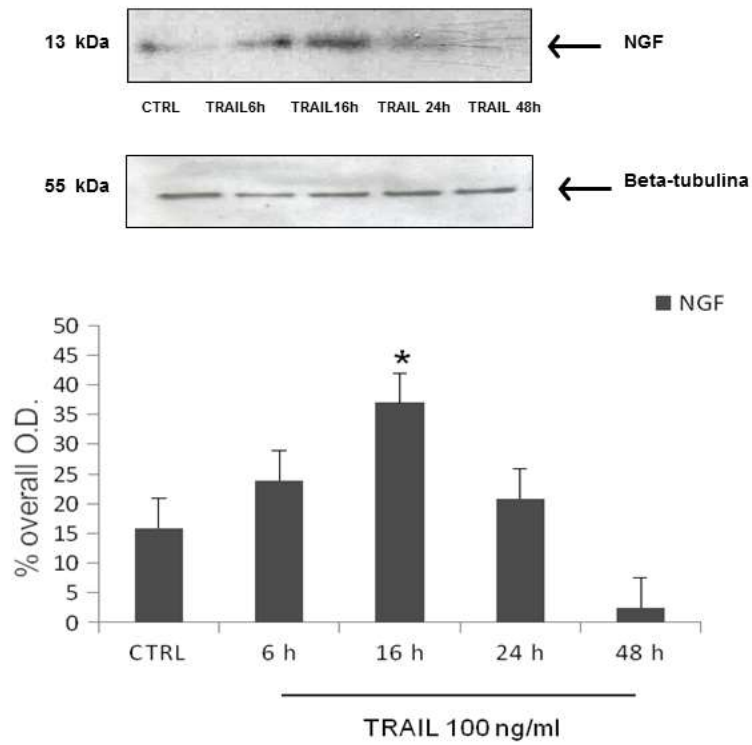


Figure 15. Espressione di NGF in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di NGF in cellule SH-SY5Y sottoposte a trattamento con TRAIL . La beta tubulina è stata usata come controllo interno. b) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di NGF relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

Inoltre, è stata valutata la capacità della citochina TRAIL di modulare vie di sopravvivenza neuronale, come la MAPK/ERK, quantificando la fosforilazione della proteina ERK 1/2.

E' stata analizzata con la tecnica del Western Blot l'espressione della forma fosforilata ERK 1/2 in cellule SH-SY5Y in seguito a trattamento con TRAIL dopo 6 h, 16 h, 24 h, 48 h. Nell'analisi proteica si nota un aumento dell'espressione della forma fosforilata dopo 6h – 16 h per poi decrescere dopo 48 h di incubazione con TRAIL (questo è in accordo con i dati presenti in letteratura, Cantarella et al., 2007) (Figura 16).

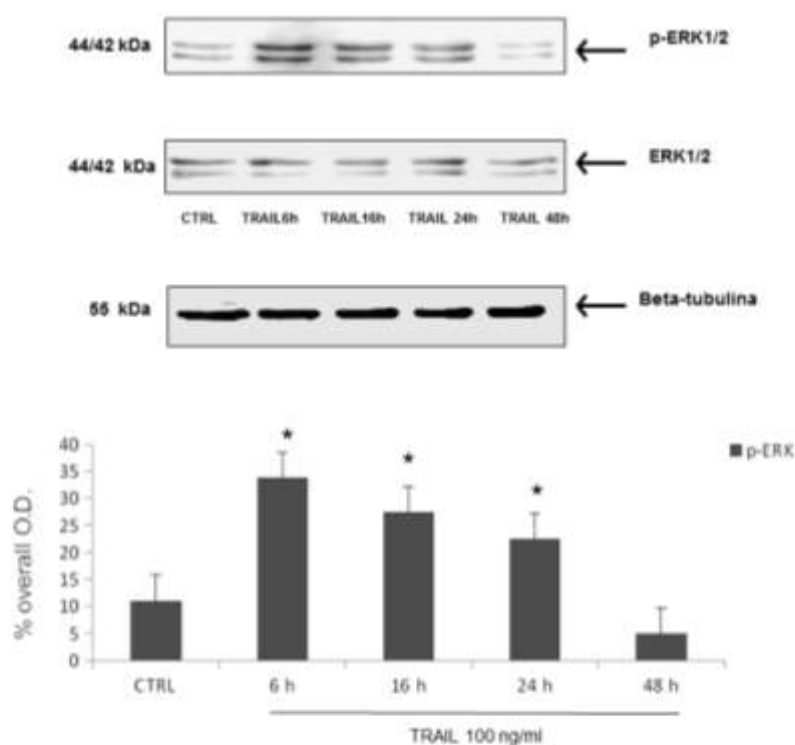


Figure 16. Espressione di p-ERK1/2 e ERK in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di p-ERK1/2 in cellule SH-SY5Y sottoposte a trattamento con TRAIL. b) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di ERK1/2 in cellule SH-SY5Y sottoposte a trattamento con TRAIL. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. c) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di p-ERK relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

TRAIL e NGF modulano la fosforilazione di AKT.

L'espressione di p-AKT è stata valutata tramite analisi proteiche di western blot al fine di determinare la capacità della citochina TRAIL e della neurotrofina NGF nella modulazione della via di sopravvivenza neuronale PI3K/Akt. Le cellule SH-SY5Y, dopo differenziamento, sono state incubate fino a 48h con TRAIL e NGF. Sono stati creati tre gruppi di studio, così suddivisi: -trattamento con TRAIL in quattro tempi differenti (6 h, 16 h, 24 h, 48 h); -trattamento con NGF in quattro tempi differenti (6 h, 16 h, 24 h, 48 h); -pretrattamento di un'ora con NGF e successivo trattamento con TRAIL in quattro tempi differenti (6 h, 16 h, 24 h, 48 h).

TRAIL aumenta l'espressione della proteina fosforilata AKT con un picco dopo 24 h di incubazione.

Un dato importante si ottiene dopo 48h di trattamento, dove TRAIL riduce drasticamente i livelli della proteina AKT fosforilata, mentre la sua espressione dopo pretrattamento con NGF non è ridotta. Così, il pretrattamento con NGF favorisce l'attivazione della via di sopravvivenza AKT. (figure 17-18-19-20).

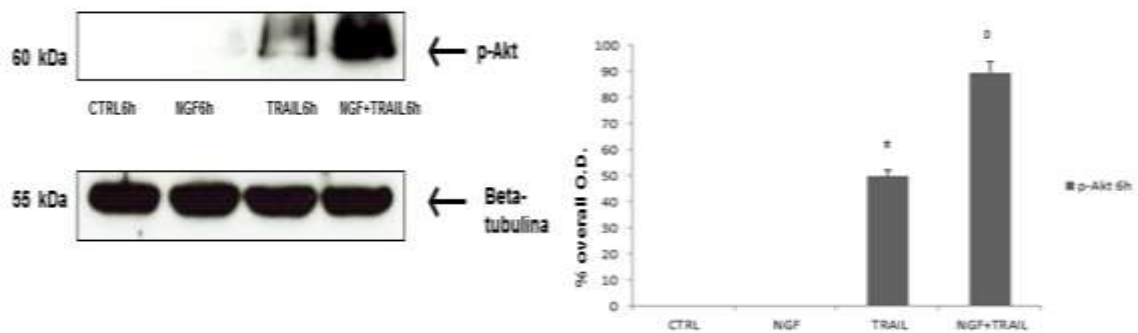


Figure 17. Espressione di p-Akt in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di p-Akt in cellule SH-SY5Y sottoposte a 6 h di trattamento con TRAIL e NGF. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di p-Akt relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL; ° $p < 0.05$ vs TRAIL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

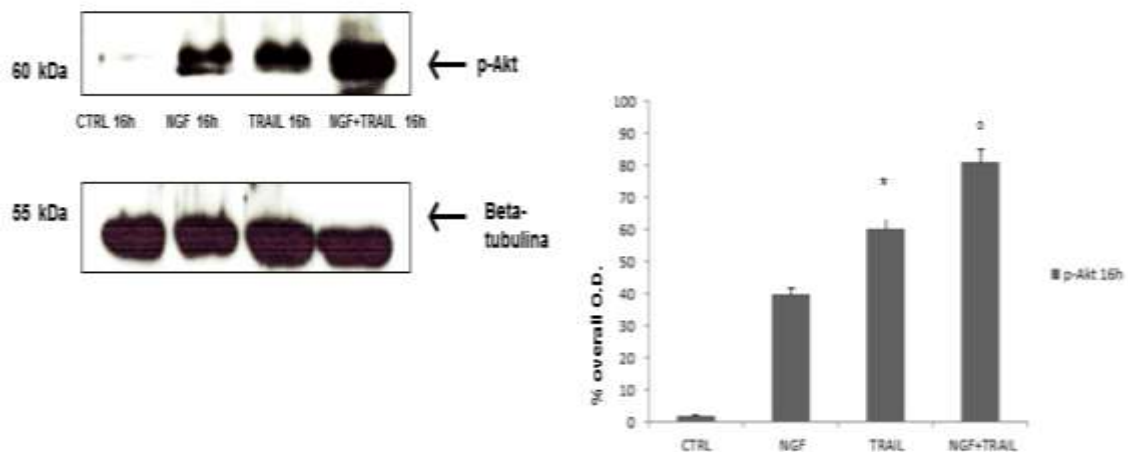


Figure 18. Espressione di p-Akt in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di p-Akt in cellule SH-SY5Y sottoposte a 16 h di trattamento con TRAIL e NGF. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di p-Akt relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL; ° $p < 0.05$ vs TRAIL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

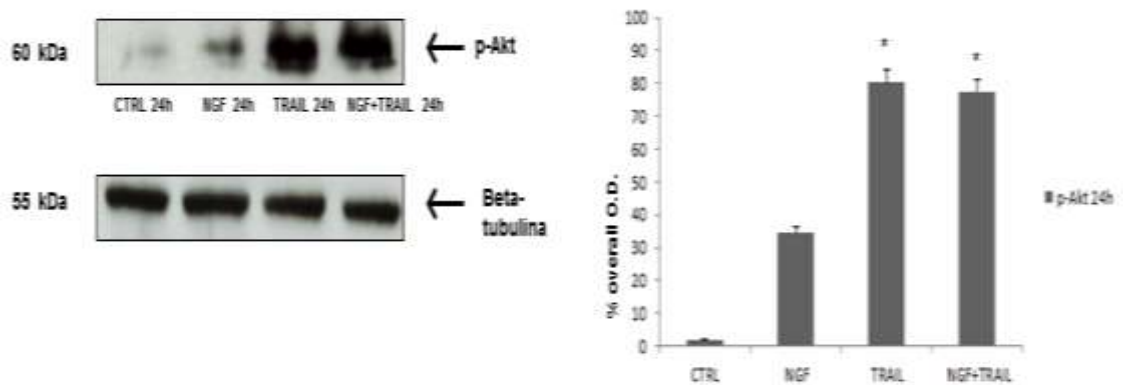


Figure 19. Espressione di p-Akt in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di p-Akt in cellule SH-SY5Y sottoposte a 24 h di trattamento con TRAIL e NGF. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di p-Akt relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

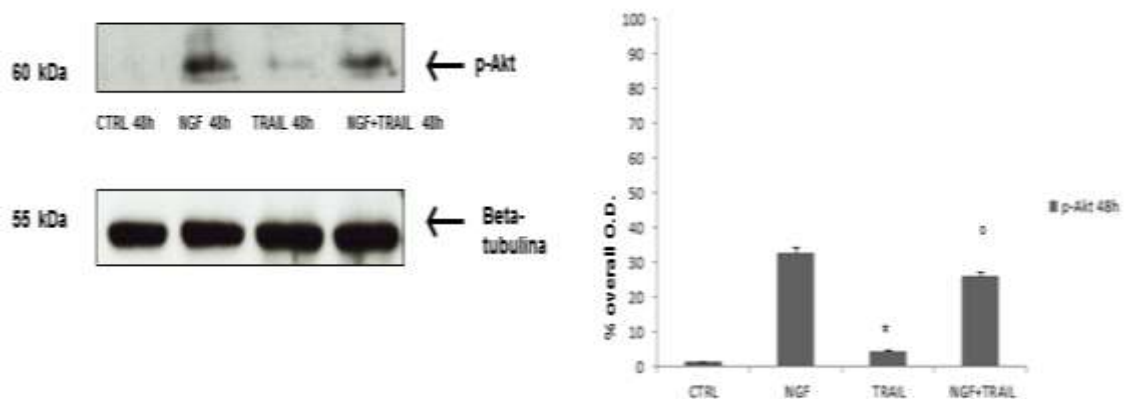


Figure 20. Espressione di p-Akt in cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF. a) Immagine di Western blot rappresentativo che mostra l'espressione di p-Akt in cellule SH-SY5Y sottoposte a 48 h di trattamento con TRAIL e NGF. La beta tubulina è stata usata come controllo interno. B) Analisi densitometrica dell'espressione proteica di p-Akt relativa alla beta tubulina. * $p < 0.05$ vs CTRL (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test).

NGF protegge le cellule dalla morte cellulare mediata da TRAIL.

Successivamente, è stata determinata la vitalità cellulare mediante saggio MTT. Questo saggio è stato effettuato su cellule differenziate SH-SY5Y trattate con TRAIL e NGF e/o inibitori delle caspasi a diverse concentrazioni. In accordo con i dati di analisi di western blot, NGF protegge le cellule dalla morte cellulare indotta da TRAIL.

(Figura 21, Pannello A,B).

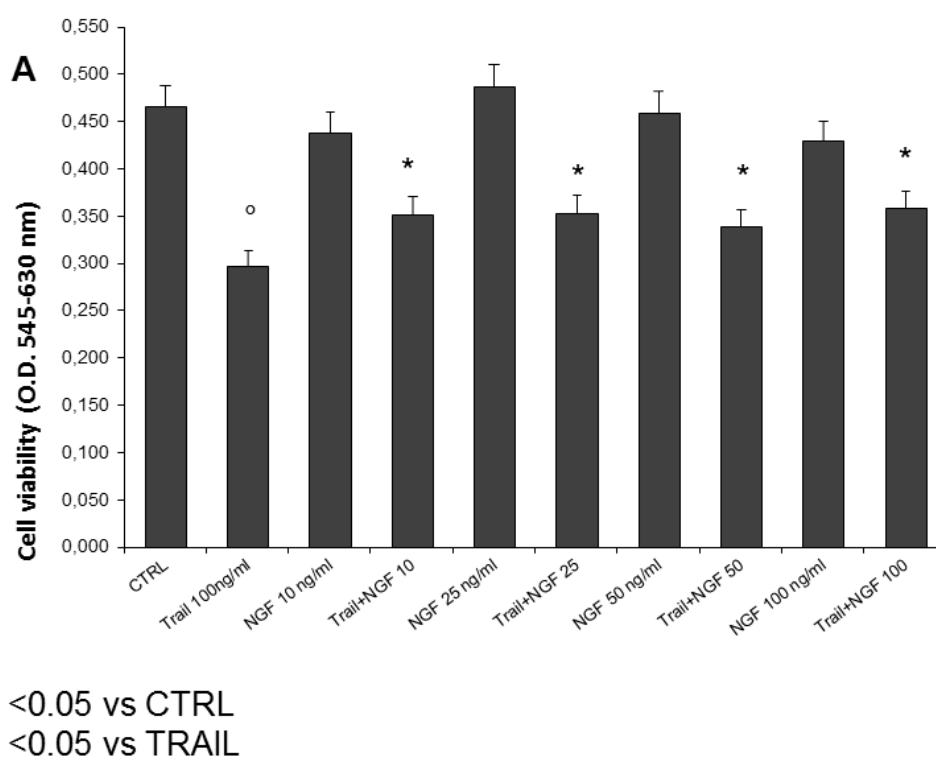


Figura 21. Pannello A.

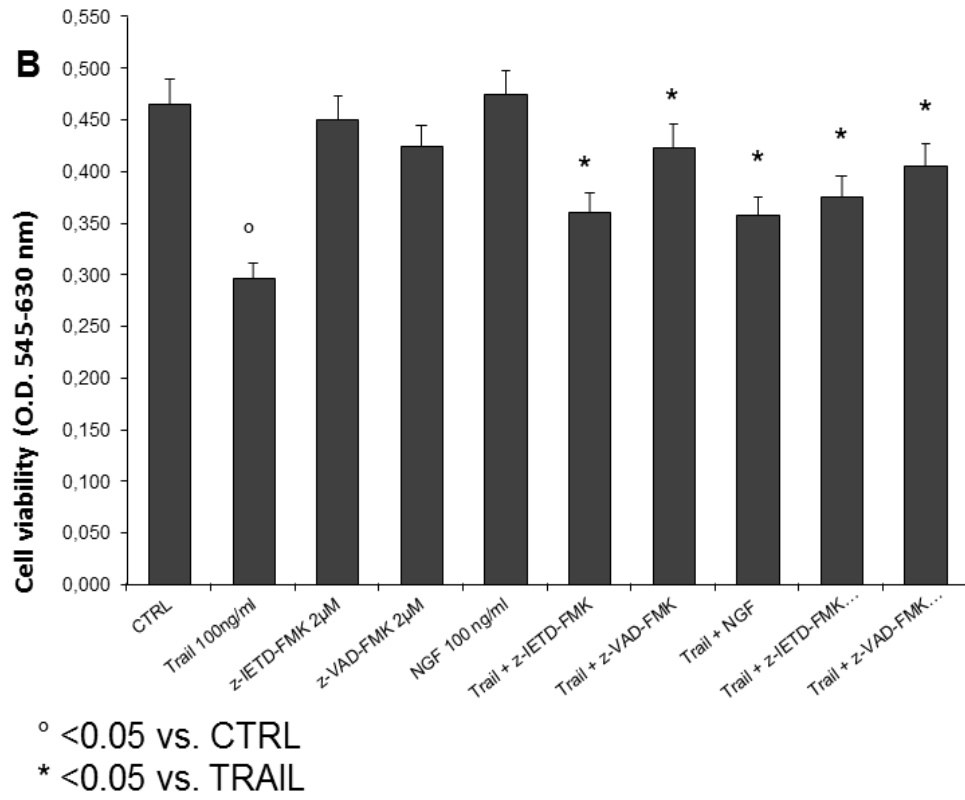


Figura 21. Pannello B.

Saggio proprio ioduro e fluoresceina.

Al fine di valutare gli effetti citotossici è stato effettuato il seguente saggio: incorporazione di propidio ioduro-fluoresceina diacetato. Il propidio ioduro (PI) viene escluso dalle cellule la cui membrana plasmatica è integra, altrimenti penetra e si lega agli acidi nucleici marcando le cellule di rosso. La fluoresceina-diacetato (FDA) attraversa la membrana e viene idrolizzata da esterasi intracellulari per produrre una fluorescenza giallo-verde. Tale fluorescenza indica che le cellule sono vitali. L'incorporazione di PI-FDA è stata quantificata mediante osservazione al microscopio a fluorescenza (figura 22).

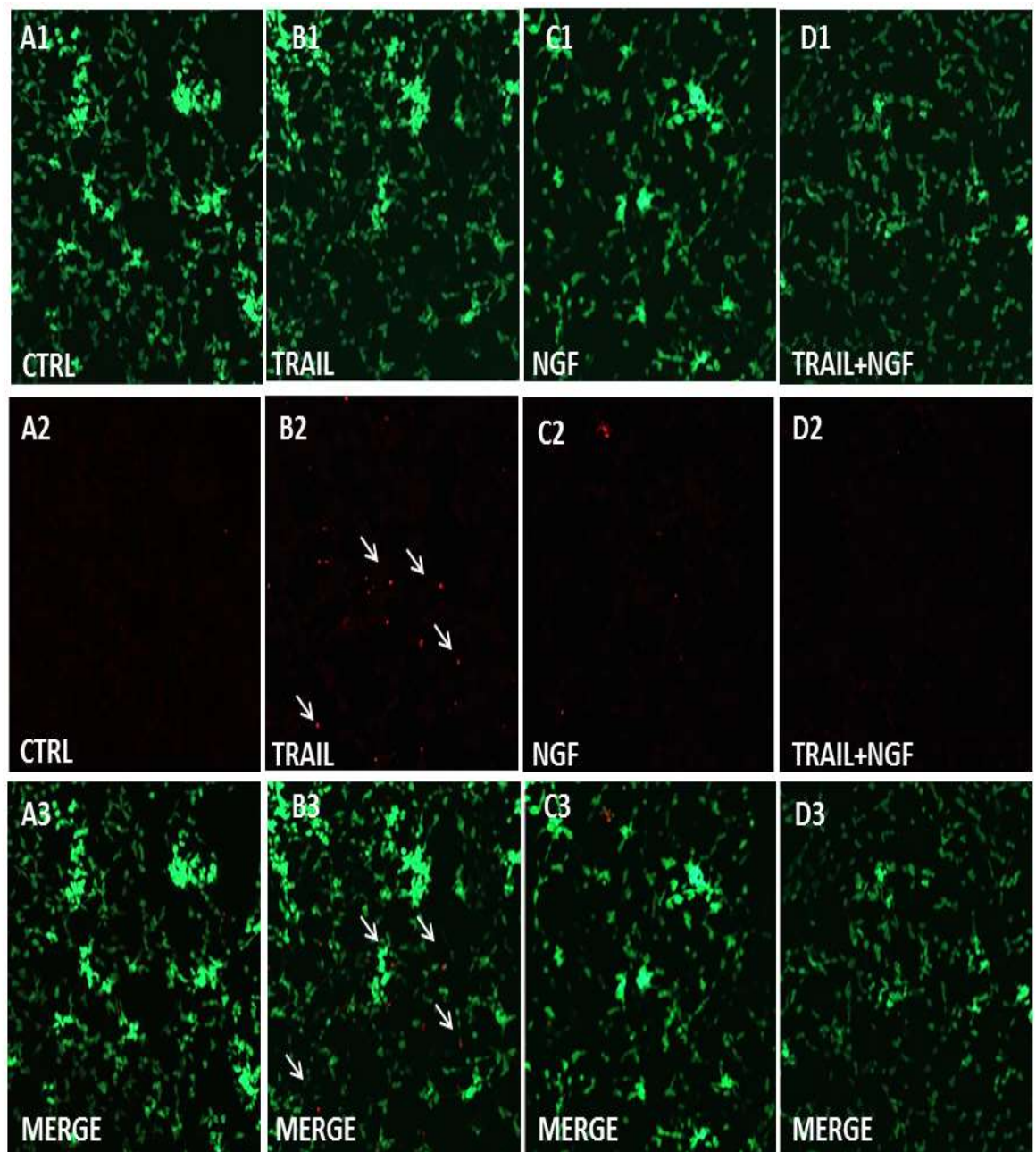


Figure 22. Saggio proprio ioduro e fluoresceina. Le cellule SH-SY5Y trattate con TRAIL 100ng/ml (**B1,B2,B3**), NGF 25ng/ml (**C1,C2,C3**) e NGF+TRAIL (**D1,D2,D3**) for 24 h. Colorazione verde per le cellule vitali(**A1,B1,C1,D1**), Colorazione rossa per cellule morte(**A2,B2,C2,D2**) e merge (**A3,B3,C3,D3**).

Misurazione dell'attività dello scambiatore NCX in seguito a trattamento con TRAIL.

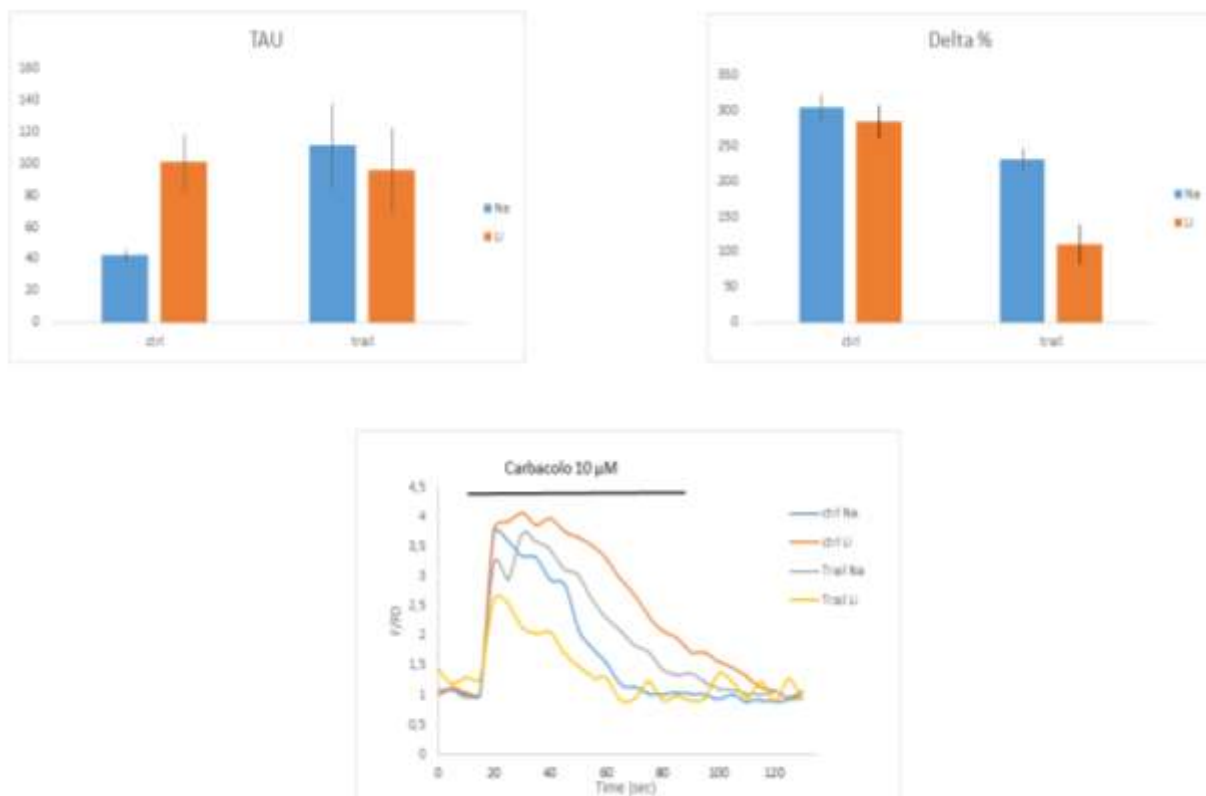


Figura 23. Attraverso la valutazione di Tau, è possibile notare che il trattamento con la citochina TRAIL riduce l'attività dello scambiatore NCX.

DISCUSSIONE

La malattia di Alzheimer è una delle più comuni patologie neurodegenerative correlate all'età. E' stimato che, a partire dal 2050, le diagnosi annuali saranno più di 11 milioni (Alzheimer's Association, 2015); queste cifre sono destinate a crescere ad un ritmo sempre più incalzante (Rapporto Mondiale Alzheimer 2015). Le attuali terapie non modificano il decorso della malattia, ma alleviano i sintomi. Ci sono molti piani terapeutici che non hanno avuto successo nell'AD; ad esempio, l'uso di antiinfiammatori, statine e farmaci ormonali (Waite LM, 2015), pertanto è importante sviluppare nuovi approcci farmacologici che potrebbero migliorare l'esito clinico.

La morte delle cellule neuronali tipica nell'AD è associata all'accumulo di placche di A β . Dati riportati in letteratura dimostrano il coinvolgimento della citochina TRAIL nella neurotossicità indotta da A β , quindi TRAIL media la morte neuronale e la sua inibizione favorisce la neuroprotezione. In particolare, dopo trattamento con A β , la linea cellulare neuronale SH-SY5Y rilascia nel mezzo di coltura una notevole quantità di TRAIL, innescando il processo di morte programmata attraverso l'attivazione del suo recettore di morte. Inoltre, trattando le cellule SH-SY5Y solo con la citochina TRAIL si innesca morte cellulare, questo indica che TRAIL ha una proprietà intrinseca di neurotossicità (Cantarella et al., 2003).

L'alterazione neuronale dell'omeostasi del Ca²⁺ è una caratteristica nell'AD (Khachaturian ZS, 1987). Cambiamenti ai livelli di Ca²⁺ favoriscono eventi che conducono alla morte cellulare, come l'apoptosi. Nei modelli cellulari di AD l'efflusso di Ca²⁺, con un rapido incremento del suo contenuto a livello dei neuroni, conduce a deficit sinaptico e neurotossicità (Smith et al., 2005). Il Ca²⁺ svolge un ruolo chiave nell'AD ed è rilevante la regolazione dei meccanismi che sono alla base del suo rilascio dai depositi. Lo scambiatore NCX è implicato nel mantenimento dell'omeostasi del Ca²⁺ (Philipson and Nicoll, 2000), (Bers DM, 2002). E' noto che l'inattivazione dello scambiatore di membrana può contribuire a sostenere elevati contenuti di Ca²⁺ a livello dei neuroni, prevenendo la fuoriuscita del Ca²⁺ citosolico (Bano et al., 2005). Quando la concentrazione citoplasmatica di Ca²⁺ è alta, lo scambiatore NCX3 estrude Ca²⁺ dal citosol in cambio di ioni Na⁺ (Lytton, 2007).

Ad oggi risulta abbastanza chiaro che NCX3 svolge un ruolo importante, pertanto questa attività di ricerca ha avuto come scopo quello di provare a chiarire *in vitro* il ruolo di NCX3 a livello del danno tossico in seguito al trattamento con la citochina proapoptotica TRAIL. Il coinvolgimento dello scambiatore NCX3 è supportato da dati ottenuti tramite analisi proteica di Western Blotting che dimostrano una riduzione dell'espressione dello scambiatore in cellule trattate con TRAIL. In particolare, i livelli intracellulari della proteina NCX3 appaiono ridotti significativamente dopo 24 h di trattamento, suggerendo una riduzione della sua attività. La preincubazione con NGF si è dimostrata efficace nel proteggere le cellule dalla morte apoptotica indotta da TRAIL, dato confermato sia dal saggio con propidio ioduro-fluoresceina diacetato e sia dal saggio di vitalità cellulare MTT. Inoltre, la preincubazione con NGF attenua la riduzione dell'espressione della proteina NCX3. NGF è una neurotrofina che provoca l'attivazione di geni che presiedono alla crescita delle fibre nervose ed inattiva geni che conducono alla morte cellulare programmata (Kucharczyk M et al., 2015). Nel saggio di vitalità cellulare MTT, la riduzione della mortalità dopo preincubazione di NGF è comparabile all'azione degli inibitori delle caspasi 8 come z-IETD-FMK e degli inibitori delle pancaspasi z-VAD-FMK. Inoltre, tali inibitori contrastano la neurotossità indotta da TRAIL.

Allo scopo di confermare ulteriormente i dati ottenuti, è stata determinata l'attività dello scambiatore NCX. In base ai dati ottenuti, attraverso la valutazione di TAU, è possibile confermare che l'attività dello scambiatore NCX3 è ridotta in seguito al trattamento con la citochina TRAIL.

I risultati ottenuti indicano che TRAIL svolge un effetto neurotossico sulla linea cellulare neuronale umana SH-SY5Y, poiché riduce l'effetto neuroprotettivo indotto da NCX3. I relativi effetti neurotossici possono essere neutralizzati inibendo il meccanismo di trasduzione di TRAIL. Infine, questi dati suggeriscono che l'inibizione degli effetti neurotossici di TRAIL potrebbero rappresentare un potenziale strumento terapeutico per intervenire sulle malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer.

BIBLIOGRAFIA

- Almasan A, Ashkenazi A. *Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy*. Cytokine Growth Factor Rev. (2003); 14(3-4):337-48.
- Alzheimer's Association. *2015 Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimers Dement. (2015); 11(3):332-84.
- Annunziato L, Molinaro P, Secondo A, Pannaccione A, Scorziello A, Pignataro G, Cuomo O, Sirabella R, Boscia F, Spinali A, Di Renzo G. *The Na⁺/Ca²⁺ exchanger: a target for therapeutic intervention in cerebral ischemia*. New Strategies in Stroke Intervention: Ionic Transporters, Pumps, and New Channels. (2009); 65–88.
- Artero S, Ritchie K *The detection of mild cognitive impairment in the general practice setting*. Aging Ment Health. (2003); 7(4):251-8.
- Artero S, Tierney MC, Touchon J, Ritchie K *Prediction of transition from cognitive impairment to senile dementia: a prospective, longitudinal study*. Acta Psychiatr Scand. (2003); 107(5):390-3.
- Atherton J, Kurbatskaya K, Bondulich M, Croft CL, Garwood CL, Chhabra R, Wray S, Jeromin A, Hanger DP, Noble W. *Calpain cleavage and inactivation of the sodium calcium exchanger-3 occur downstream of A β in Alzheimer's disease*. Aging Cell. (2014); 13:49-45.
- Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L. *Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity*. Cell. (2005); 120:275-285.
- Becker RE, Greig NH, Giacobini E. *Why do so many drugs for Alzheimer's disease fail in development? Time for new methods and new practices?* J Alzheimers Dis. (2008); 15(2):303-25.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Bio. (2000); 1:11-21.
- Bers DM. *Cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference?* J Mol Cell Cardiol. (2002); 34:369-373.

- Besserer GM, Ottolia M, Nicoll DA, Chaptal V, Cascio D, Philipson KD, Abramson J. *The second Ca²⁺-binding domain of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger is essential for regulation: crystal structures and mutational analysis.* Proc Natl Sci USA (2007); 104:18467-18472.
- Bethesda MD. *Genes and Disease.* National Center for Biotechnology Information (US) (1998).
- Bhardwaj A, Aggarwal BB. *Receptor-mediated choreography of life and death.* J Clin Immunol. (2003); 23:317-332.
- Bossy-Wetzell E, Schwarzenbacher R, Lipton SA *Molecular pathways to neurodegeneration.* Nat Med. (2004); 10:S2-9.
- Canitano A, Papa M, Boscia F, Castaldo P, Sellitti S, Tagliatela M, Annunziato L. *Brain distribution of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger-encoding genes NCX1, NCX2, and NCX3 and their related proteins in the central nervous system.* Ann N Y Acad Sci. (2002;) 976:394-404.
- Cannella B, Gaupp S, Omari KM, Raine CS. *Multiple sclerosis: death receptor expression and oligodendrocyte apoptosis in established lesions.* J Neuroimmunol. (2007); 188:128-137.
- Cantarella G, Uberti D, Carsana T, Lombardo G, Bernardini R, Memo M. *Neutralization of TRAIL death pathway protects human neuronal cell line from 1302–1314.β-amyloid toxicity.* Cell Death Differ. (2003); 10:134-141.
- Cantarella G, Lempereur L, D'Alcamo MA, Risuglia N, Cardile V, Pennisi G, Scoto GM, Bernardini R. *Trail interacts redundantly with nitric oxide in rat astrocytes: Potential contribution to neurodegenerative processes.* Journal of Neuroimmunology. (2007); 182:41-47.
- Cantarella G, Di Benedetto G, Scollo M, Paterniti I, Cuzzocrea S, Bosco P et al. *Neutralization of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reduces spinal cord injury damage in mice.* Neuropsychopharmacology. (2010); 35:
- Castaldo P, Cataldi M, Magi S, Lariccia V, Arcangeli S, Amoroso S. *Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases.* Prog Neurobiol. (2009); 87:58-79.

- Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. *Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases*. *Front Cell Neurosci*. (2015); 9:124.
- Dawbarn D, Alle S.J. *Neurotrophins and neurodegeneration*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. (2003); 29:211-230.
- Dörr J, Bechmann I, Waiczies S, Aktas O and Zipp F. *Lack of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand but presence of its receptors in the human brain*. *J Neurosci*. (2002); 22:RC209.
- Duiker EW, Mom CH, De Jong S, Willemsen PHB, Gietema JA, Van Der Zee AGJ, De Vries EGE. *The clinical trial of TRAIL*. *Eur J Canc*. (2006); 42: 2233-2240.
- Eid MA, Lewis RW, Kumar MV. *Mifepristone pretreatment overcomes resistance of prostate cancer cells to tumor necrosis factor α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. *Mol Cancer Ther*. (2002); 1:831-840.
- Etienne P, Baudry M. *Calcium dependent aspects of synaptic plasticity, excitatory amino acid neurotransmission, brain aging and schizophrenia: a unifying hypothesis*. *Neurobiol Aging* (1987); 8:362–366.
- Falschlehner C, Schaefer U and Walczak H. *Following TRAIL's path in the immune system*. *Immunology*. (2009); 127:145-54.
- Formisano L, Saggese M, Secondo A, Sirabella R, Vito P, Valsecchi V, Molinaro P, Di Renzo G, Annunziato L. *The two isoforms of the Na^+ /Ca^{2+} exchanger, NCX1 and NCX3, constitute novel additional targets for the prosurvival action of Akt/protein kinase B pathway*. *Mol. Pharmacol*. (2008); 73:727–737.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. (1999); 66(2):137-147.
- Fraysse B, Rouaud T, Millour M, Fontaine-Perus J, Gardahaut MF, Levitsky DO. *Expression of the $Na^+ -Ca^{2+}$ exchanger in skeletal muscle*. *Am J Physiol Cell Physiol*. (2001); 280:146-154.

- Gaur U, Aggarwal BB. *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily*. *Biochem Pharmacol.* (2003); 66:1403-1408.
- Godyn J, Jonczk J, Panek D, Malawska B. *Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials*. *Pharmacological Reports* (2016); 68(1):127-38.
- Guo Y, Chen C, Zheng Y, Zhang Jet, Liu Y. *A novel anti-human DR5 monoclonal antibody with tumoricidal activity induces caspase-dependent and caspase-independent cell death*. *J Biol Chem.* (2005); 280:41940-41952.
- Held J, Schulze-Osthoff K. *Potential and caveats of TRAIL in cancer therapy*. *Drug Resist Updat.* (2001); 4:243-52.
- Henry JD, von Hippel W, Molenberghs P, Lee T, Sachdev PS *Clinical assessment of social cognitive function in neurological disorders*. *Nat Rev Neurol.* (2016); 12(1):28-39.
- Hilgemann DW. *The cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in giant membrane patches*. *Ann N Y Acad Sci.* (1996); 779:136-158.
- Hiller R, Shpak C, Shavit G, Shpak B, Khananshvili D *An unknown endogenous inhibitor of Na⁺-Ca²⁺ exchange can enhance the cardiac muscle contractility*. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 277:138-146.
- Huang Y, Erdmann N, Peng H, Zhao Y, Zheng J. *The role of TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand in neurodegenerative diseases*. *Cell Mol Immunol.* (2005); 2:113-122.
- Hymowitz SG, O'Connell MP, Ultsch MH, Hurst A, Totpal K, Ashkenazi A, de Vos AM, Kelley RF. *A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL*. *Biochemistry.* (2000); 39(4):633-40.
- Jackson WS. *Selective vulnerability to neurodegenerative disease: the curious case of Prion Protein*. *Dis Model Mech* (2014); 7(1):21-9.
- Jeffs GJ, Meloni BP, Bakker AJ, Knuckey NW. *The role of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX) in neurons following ischaemia*. *J Clin Neurosci.* (2007); 14:507-514.

- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A. *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature. (1987); 325:733-736.
- Kaplan DR, Miller FD. *Neurotrophin signal transduction in the nervous system*. Current Opinion in Neurobiology. (2000); 10:381-391.
- Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG. *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science (2003); 300(5618):486-9.
- Khachaturian ZS. *Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain*. Neurobiol Aging. (1987); 8:345-346.
- Kimberley FC e Screaton GR. *Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors*. Cell Res. (2004); 14:359-372.
- Komine O, Yamanaka K. *Neuroinflammation in motor neuron disease*. Nagoya J Med Sci. (2015); 77(4):537-49.
- Kang TM, Hilgemann DW. *Multiple transport modes of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger*. Nature. (2004); 427:544-548.
- Kucharczyk M, Kurek A, Detka J, Slusarczyk J, Papp M, Tota K et al. *Chronic mild stress influences nerve growth factor through a matrix metalloproteinase-dependent mechanism*. Phyc. (2015); 66:11-21.
- Landfield PW. *'Increased calcium-current' hypothesis of brain aging*. Neurobiol Aging. (1987); 8:346-347.
- Landfield PW, Campbell LW, Hao SY. *Aging-related increases in voltage-sensitive, inactivating calcium currents in rat hippocampus. Implications for mechanisms of brain aging and Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci. (1989); 568:95-105.
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. Cell Death Diff. (2003);10:66-75.
- Lee SL, Yu AS, Lytton J. *Tissue-specific expression of Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoforms*. J Biol Chem. (1994); 269:14849-14852.

- Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. *Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors.* J. Neurosci. (2011); 31:6627-6638.
- Li ZP, Tang CS, Su JY. *Role of Na⁺-Ca²⁺ exchange system in the pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion damage.* Sci China B. (1991); 34:599-605.
- Lorenzon MB, Beam KG. *Calcium channelopathies.* Kidney Int. (2000); 57:794-802.
- Lund and Manchester groups *Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia.* Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry (1994); 57:416-418.
- Lytton J. *Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport.* Biochem. (2007); 406:365-382.
- Matsuoka S, Nicoll Da, Hryshko LV, Levitsky DO et al. *Regulation of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger by Ca²⁺. Mutational analysis of the Ca²⁺ -binding domain.* J Gen Phy. (1995); 105:403-420.
- McCaulley ME, Grush KA *Alzheimer's Disease: Exploring the Role of Inflammation and Implications for Treatment.* Int J Alzheimers Dis (2015):515248.
- Merlini G and Bellotti V. *Molecular mechanisms of amyloidosis.* N Engl J Med (2003); 349(6):583-96.
- Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, Salucci S, Magi S, Amoroso S. *Cellular and subcellular localization of Na⁺/Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat.* Cell Calcium. (2007); 41:221-234.
- Nicoll Da, Longoni S, Philipson KD. *Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger.* Science. (1990); 250:562-565.

- Nicoll DA, Quednau BD, Qui Z, Xia YR, Lusic AJ, Philipson KD. *Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3*. J Biol Chem. (1996); 271:24914-24921.
- Nicoll DA, Ottolia M, Philipson KD. *Toward a topological model of the NCX1 exchanger*. Ann N Y Acad Sci. (2002); 976:11-18.
- Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN et al. *Human brain-cell death induced by tumor-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. Lancet (2000); 356:827-828.
- Pahlman S, Ruusala AL, Abrahamsson L, Matsson ME, Esscher T. *Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-estr-induced differentiation*. Cell Differ. (1984); 14:135-144.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J and Dixit VM. *The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL*. Science. (1997); 276:111-113.
- Philipson KD, Nicoll DA. *Sodium-calcium exchange: a molecular perspective*. Annu Rev Physiol. (2000); 62:111-113.
- Picken MM *Proteomics and mass spectrometry in the diagnosis of renal amyloidosis*. Clin Kidney J. 2015; 8(6):665-72.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A and Ashkenazi A. *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor receptor family*. Biol Chem. 1996; 271:12687-12690
- Prasad KN, Cole WC, Hovland AR, Prasad KC, Nahreini P, Kumar B, Edwards-Prasad J, Andreatta CP *Multiple antioxidants in the prevention and treatment of neurodegenerative disease: analysis of biologic rationale*. Current Opinion in Neurology (1999); 12:761-70.
- Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL. *The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging (1991); 12:295-312.
- Probst A, Langui D, Ulrich J. *Alzheimer's disease: a description of the structural lesions*. Brain Pathol. (1991); 1:229-239.

- Quednau BD, Niccol Da, Philipson KD. *Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat.* Am J Phys. (1997); 272:1250-1261.
- Reuter H, Philipson KD. *Sodium-calcium exchanger overexpression in the heart: insights from a transgenic mouse model.* Basic Res Cardiol. (2002); 97(1):31-35.
- Ross CA, Poirier MA *Protein aggregation and neurodegenerative disease.* Nat Med (2004); 10:10-7
- Sanchez-Nino MD, Benito-Martin A, Gonc S, Sanz AB, Ucerro AC, Izquierdo MC, Ramos AM, Berzal S, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J and Ortiz A. *TNF Superfamily: A Growing Saga of Kidney Injury Modulators.* Mediators Inflamm (2010).
- Schellenberg GD, Montine TJ. *The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease.* Acta Neuropathol. (2012); 124:305-323.
- Selkoe DJ. *The origins of Alzheimer's disease: A is for amyloid.* JAMA. (2000); 283:1615-1617.
- Selkoe DJ, Podlisny MB *Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease.* Annu Rev Genomics Hum Genet (2002); 3:67-99.
- Shaul YD, Seger R. *The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions.* Biochimica et Biophysica Acta. (2007); 1773:1213–1226.
- Sirabella R, Secondo A, Pannaccione A, Molinaro P, Formisano L, Guida N, Di Renzo G, Annunziato L, Cataldi M. *ERK1/2, p38, and JNK regulate the expression and the activity of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCX1, NCX2, and NCX3, in neuronal PC12 cells.* Journal of Neurochemistry (2012); 122:911-922.
- Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda S, Merlini G, Saraiva MJ, Westermark P *Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis.* Amyloidi (2010);17(3-4):101-4.

- Small DH. *Dysregulation of calcium homeostasis in Alzheimer's disease*. Neurochem. Res. (2009); 34:1824-1829.
- Smith IF, Green KN, LaFerla FM. *Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: recent advances gained from genetically modified animals*. Cell Calcium. (2005); 38:427-437.
- Sureda FX, Junyent F, Verdaquer E, Auladell C, Pelegri C, Vilaplana J, Folch J, Canudas AM, Zarate CB, Pallès M, Camins A. *Antiapoptotic drugs: a therapeutic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases*. Curr Pharm Des. (2011); 17(3):230-45.
- Torok TL. *Electrogenic Na⁺-Ca²⁺ exchanger of nerve and muscle cells*. Prog Neurobiol. (2007); 82:287-347.
- Toth A, Kiss L, Varro A, Nanasi PP. *Potential therapeutic effects of Na⁺-Ca²⁺ exchanger inhibition in cardiac diseases*. Curr Med Chem. (2009); 16:3294-3321.
- Uberti D, Rizzini C, Spano PF, Memo M. *Characterization of tau proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y*. Neurosci. (1997); 235:149-153.
- Uberti D, Cantarella G, Facchetti F, Cafici A, Grasso C, Bernardini R, Memo M. *TRAIL is expressed in the brain cells of Alzheimer's disease patients*. NeuroReport. (2004);15:579-581.
- Voigt S, Philipp S, Davarnia P, Winoto-Morbach S, Adam D. *TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells*. BMC Cancer. (2014); 14:74.
- Waite LM. *Treatment for Alzheimer's disease: has anything changed?* Aust Prescr. (2015); 38(2):60-3.
- Walczak H, Haas TL. *Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex*. Methods Mol Biol. (2008); 414:221-39.
- Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. *Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins*. Science (1999); 286(5446):1888-93.

- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Davis-Smith T, Rauch C, Smith CA and Goodwin RG. *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity. (1995);3:673-682.
- Xiaojuan S, Wei-Dong C, Yan-Dong W. *β -amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Front Pharmacol (2015); 6:221.
- Yadahalli S and Gosavi S. *Functionally relevant specific packing can determine protein folding routes*. J Mol Biol. (2015 Dec).
- Yuan J, Yankner BA. *Apoptosis in the nervous system*. Nature. (2000); 407:802-809.
- Zempel H and Mandelkow EM. *Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia*. Mol Neurodegener. (2015); 10(1):68.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Professore Salvatore Amoroso per avermi supportato durante questi tre anni di studio di dottorato e per avermi introdotto alla ricerca scientifica.

Desidero ringraziare il Professore Renato Bernardini per i preziosi insegnamenti e per avermi dato la possibilità di poter lavorare nel suo gruppo di ricerca.

Ringrazio la Professoressa Giuseppina Cantarella per la sua disponibilità e per suggerimenti necessari allo sviluppo di questo studio.

Un ringraziamento speciale al Dottor Vincenzo Lariccia e alle Dottoresse Pasqualina Castaldo, Simona Magi per preziosi consigli, fondamentali per la stesura della tesi.

Per aver condiviso questa esperienza, ringrazio le mie colleghe ed amiche Dottoresse Giulia di Benedetto, Loredana Macrì, Alessandra Matteucci, Sara Arcangeli, Guendalina Bastioli e Marta Maiolino e i tecnici di laboratorio Gerardo Galeazzi, Carlo Violet e Franco Pettinari che in momenti diversi e in vari modi mi hanno prestato il loro aiuto.

Un sentito ringraziamento alla mia Famiglia e ai miei affetti più cari per avermi sostenuta ed incoraggiata incondizionatamente con grande affetto.