

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
PSICOLOGIA CLINICA

Taupatie: nuove prospettive di intervento per l'invecchiamento patologico.

Tesi di laurea in

PSICOFISIOLOGIA CLINICA

Relatore

Chiar.mo Luppi Marco

Presentata da

Lomuscio Lorena

Sessione III

Anno Accademico 2018/2019

*A mia nonna,
ti sento fare il tifo da lassù.*

INDICE

1 INTRODUZIONE	5
1.1 La proteina Tau e le taupatie	5
1.1.1 Inquadramento delle demenze.....	8
1.1.2 La malattia d'Alzheimer	9
1.1.3 Demenza fronto-temporale	11
1.1.4 Degenerazione corticobasale	12
1.1.5 Paralisi sopranucleare progressiva	12
1.2. La diagnosi di demenza	13
1.2.1 Effetti dell'invecchiamento normale a livello cognitivo	14
1.2.2 Effetti dell'invecchiamento normale a livello fisiologico.....	16
1.3 La sofferenza del paziente con demenza.....	18
1.4 Il caregiving.....	27
2. SCOPO DELLA RICERCA	31
3 MATERIALI E METODI	32
3.1 Animali.....	32
3.1.1Chirurgia.....	32
3.1.2 Torpore artificiale.....	33
3.2 Procedura sperimentale	33
3.2.1 Immunoistochimica.....	34
3.2.2Acquisizione delle immagini e analisi.....	35
3.2.3 Analisi statistica.....	35
4. TABELLE E FIGURE.....	36
5. RISULTATI.....	44
6. DISCUSSIONE.....	45
7. CONCLUSIONI.....	48
Bibliografia.....	49

ABSTRACT

L'accumulo di proteina tau (Tau) iperfosforilata è tipico di alcuni disordini neurodegenerativi detti taupatie, di cui la sindrome d'Alzheimer è la più nota. Durante l'ingresso nello stato di torpore si è osservato che, negli animali ibernanti, Tau subisce il medesimo processo di iperfosforilazione, ma al ritorno alla normotermia esso si risolve fisiologicamente. Esiste una procedura per indurre farmacologicamente un torpore artificiale (TA): una condizione simile al torpore naturale in un animale non ibernante, il ratto. Lo scopo di questa tesi è studiare l'andamento della fosforilazione e della defosforilazione della Tau, durante il TA. L'iperfosforilazione di Tau è stata valutata mediante analisi immunostochimica, marcando AT8 (Tau fosforilata) o Tau-1 (Tau defosforilata), in 3 strutture cerebrali scelte sulla base del loro coinvolgimento nella regolazione delle funzioni cognitive (comportamento e memoria). È stato poi studiato lo stato di disattivazione dell'enzima GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3-beta), coinvolto nei processi di fosforilazione della Tau, marcando la sua forma a sua volta fosforilata nella posizione Ser9. I risultati mostrano che anche nel TA si ha iperfosforilazione della Tau, che si risolve fisiologicamente in poche ore di recupero. Si è visto anche che durante il TA e nel recupero la GSK3 β è inibita. Ne consegue che, probabilmente, anche nei mammiferi non-ibernanti (essere umano incluso), possa esserci una biochimica adatta, e fino ad ora sconosciuta, per far fronte a tale situazione, evitando che evolva in taupatia. Tale meccanismo fisiologico, da approfondire ulteriormente, sembra utile per nuove prospettive di intervento, soprattutto nelle fasi precoci dei malati taupatici. Il ruolo dello psicologo clinico potrebbe diventare, in questo contesto, fondamentale nel riconoscere e delineare sempre più precocemente i disturbi comportamentali che caratterizzano le demenze, favorendo l'efficacia di un trattamento sviluppato su questi studi.

1. INTRODUZIONE

1.1 La proteina Tau e le taupatie

La proteina tau (Tau) fu scoperta per la prima volta nel 1975 da Weingarten e colleghi, (Weingarten, Lockwood, Hwo e Kirschner, 1975) e da allora sono state delineate ampiamente le sue numerose funzioni. La tau è una proteina associata ai microtubuli (*microtubule associated protein*, MAP) avente un ruolo nella stabilizzazione e nella promozione della crescita assonale (Wang e Mandelkow, 2016).

È quindi una proteina strutturale che in condizione di omeostasi favorisce i movimenti (plasticità neuronale) ed è responsabile della morfologia del neurone.

I microtubuli sono strutture intracellulari e costituiscono, assieme ai neurofilamenti e ai microfilamenti, il citoscheletro del neurone. Il citoscheletro è essenziale nel determinare la forma delle cellule, costituisce una sorta di ossatura: non è statico ma molto dinamico e permette alle cellule di cambiare la loro forma. (Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum e Hudspeth, 2019).

I microtubuli hanno grandi dimensioni, si distribuiscono longitudinalmente in direzione dell'assone e dei dendriti. Essi formano lunghe impalcature che si estendono da una parte all'altra del neurone e ricoprono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella conservazione della forma della cellula. Sono costituiti da protofilamenti, ciascuno dei quali è formato da numerose paia di subunità di alfa e beta tubulina, il cui assemblaggio è regolato dalle MAP. Le proteine di tubulina si legano alla subunità vicine lungo il protofilamento. Quest'ultime hanno una struttura polare: l'estremità negativa è orientata verso il centro della cellula, mentre quella positiva si estende verso la periferia. La polimerizzazione e depolimerizzazione dei microtubuli, e quindi la forma del neurone, vengono regolate da vari segnali interni del neurone. Le MAP, tra le altre funzioni, ancorano i microtubuli l'uno all'altro e ad altre parti del neurone. Modificazioni patologiche di una MAP assonale, ovvero la tau, è implicata nelle demenze (Bear, Connors, Paradiso, 2016).

Mentre i microtubuli vanno incontro a rapidi cicli di polimerizzazione e depolimerizzazione nelle cellule, nei dendriti maturi e negli assoni (presenti nell'assoplasma, equivalente del citoplasma) essi sono molto più stabili grazie alle MAP, che determinano la polimerizzazione orientata e l'associazione dei polimeri della tubulina. Si avrà MAP2 nei dendriti, MAP3 e Tau negli assoni (Kandel et al. 2019). La Tau stabilizza i microtubuli e in particolare promuove e regola la dinamicità degli stessi, permettendo la riorganizzazione del citoscheletro. Oltre a fare ciò, la tau regola il trasporto assonale attraverso vari meccanismi, come ad esempio può rallentare il trasporto anterogrado e retrogrado influenzando la frequenza delle proteine motorie quali la kinesina e

dineina. Una piccola quantità di Tau è distribuita fisiologicamente anche nei dendriti, ad oggi però la funzione fisiologica della Tau dendritica è ancora motivo di dibattito, si pensa possa essere coinvolta nella plasticità sinaptica (Wang e Mandelkow, 2016).

L'interazione della proteina tau con i microtubuli è un processo estremamente dinamico e pertanto, come su scritto, detiene un ruolo determinante nel rimodellamento del citoscheletro e nel garantire la plasticità dei neuroni. La fosforilazione di tale proteina è alla base della regolazione del legame dinamico ai microtubuli: alti livelli di fosforilazione ne riducono il legame ai microtubuli e ciò comporta una maggiore plasticità neuronale, poiché Tau in forma iperfosforilata si distacca da essi e trasloca al compartimento somatodendritico, dove può interferire con la funzionalità delle sinapsi (Hoover, Reed, Penrod, Kotilinek, Grant, e Ashe, 2010).

Nel sistema nervoso la Tau è espressa abbondantemente sia nella divisione centrale che in quella periferica, è presente perlopiù nei neuroni ma sono stati individuati livelli bassi di Tau anche nella microglia (Wang e Mandelkow, 2016).

Questa proteina nell'essere umano è codificata dal gene MAPT. Nei neuroni adulti la Tau si distribuisce principalmente negli assoni (Wang e Mandelkow, 2016).

Svariati studi hanno identificato la proteina tau come il principale costituente proteico dei grovigli neurofibrillari (Orr, Sullivan e Frost, 2017).

Aggregati di Tau sono la caratteristica patologica primaria di una serie di disturbi neurodegenerativi chiamati taupatie (vedi Tabella 1).

Malattie con patologia neurofibrillaria a base di tau (Lee, Goedert, e Trojanowski, 2001)
Malattia d'Alzheimer
Sclerosi laterale amiotrofica/parkinsonismo demenza-complex *
Malattia dei granuli Argirofili *
Degenerazione corticobasale *
Malattia di Creutzfeldt-Jakob
Demenza pugilistica *
ammassi neurofibrillari diffusi con calcificazione *
Sindrome di Down
Demenza frontotemporale e parkinsonismo associata al cromosoma 17 *
Malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker
Sindrome di Hallervorden-Spatz.
Distrofia miotonica
Malattia di Niemann-Pick di tipo C
Malattia del motoneurone Non-Guamaniana con grovigli neurofibrillari
Malattia di Pick *
Parkinsonismo postencefalitico
Angiopatia amiloide cerebrale da prioni
Paralisi sopranucleare progressiva *
Panencefalite sclerosante subacuta
Demenza da soli grovigli *
Gliosi progressiva sottocorticale *

(Tabella 1)

* Malattie in cui i grovigli neurofibrillari patologici Tau-positivi sono le caratteristiche neuropatologiche predominanti

1.1.1 Inquadramento delle demenze

Partendo da una visione generale la demenza è definibile come:

“un deterioramento cognitivo, cioè un declino, una perdita, rispetto alle prestazioni precedenti l’inizio noto o presunto di malattia, globale (che coinvolge tutte le funzioni cognitive) e cronico, (poiché si prolunga ininterrottamente nel tempo). Il termine demenza indica una persona priva del proprio intelletto”. (Grossi, Trojano, 2011)

Le demenze sono delineate da compromissione della memoria (amnesia), da deficit nel linguaggio (afasia), deficit dalla funzione motoria (aprassia), deficit del riconoscimento (agnosia) e compromissione dalle funzioni esecutive; possono essere presenti anche alterazioni della personalità. (Ravizza 2004).

I pazienti dementi possono iniziare a notare alcuni fallimenti nella vita quotidiana soprattutto a carico della memoria o della capacità di denominare persone e oggetti. Uno dei primi segnali difatti può trattarsi dell’amnesia anterograda: i pazienti spesso dimenticano nomi di oggetti, appuntamenti rilevanti o fasi salienti e recenti della propria vita.

La frequenza dei fallimenti è progressiva e ai disturbi di memoria si aggiungono difficoltà nel risolvere compiti e eseguire calcoli semplici o a compiere procedure prima consuete (Grossi, Troiano, 2011).

A seconda delle lesioni e il rapporto tra il declino cognitivo, comportamentale e motorio che le accompagna vi sono quattro tipi di demenze:

- Demenze primarie
- Demenze secondarie
- Demenze associate
- Demenze miste

Alle demenze primarie appartengono le demenze per cui il deterioramento cognitivo e comportamentale è il sintomo predominante, fin dall’esordio anticipando i sintomi motori. Nelle demenze secondarie la disfunzione progressiva del funzionamento posturale precede, di poco o di molto, il deterioramento cognitivo. Tra le demenze associate si collocano invece malattie di diversa natura: metabolica, vascolare, infiammatoria etc. Ed infine le demenze miste in cui la demenza è il frutto cumulativo di più malattie (Bugiani e Marcon 2009).

Precisato che la proteina tau è implicata nella neurodegenerazione, il presente lavoro di ricerca avrà ripercussioni più dirette nella demenza di Alzheimer, nella sindrome cortico-basale, nella

sindrome da paralisi sopranucleare progressiva e nella demenza frontotemporale, dove la proteina tau svolge un ruolo patogenetico fondamentale.

1.1.2 La malattia d'Alzheimer

La malattia d'Alzheimer è una demenza degenerativa primaria ed è caratterizzata da un andamento lento e progressivo. I sintomi d'esordio sono di tipo cognitivo ai quali si aggiungono nel tempo disturbi psicopatologici e del comportamento, mentre i sintomi neurologici compaiono nelle fasi finali (Grossi, Trojano, 2011). È la taupatia più comune e più studiata, è la forma più frequente di demenza, soprattutto nei paesi occidentali a causa dell'incremento della popolazione anziana. Studi hanno dimostrato che è più frequente nel sesso femminile (Mutani, Lopiano, Durelli, Mauro, e Chio, 2011)

Il morbo di Alzheimer è caratterizzato da tre principali anomalie cerebrali: atrofia ippocampale, dilatazione ventricolare, assottigliamento corticale, osservabili tramite risonanza. Queste variazioni si osservano in realtà in forma più lieve anche nei pazienti anziani (Kandel et al. 2019). Ulteriori biomarker a livello biologico che sono stati riscontrati sono la formazione di placche di β amiloide e grovigli neurofibrillari (Kandel et al. 2019).

Le placche di amiloidi sono strutture neurotossiche che derivano da alcuni peptidi che si formano da un alterato processamento della proteina precursore dell'amiloide (Kandel et al 2019). Il principale costituente di tali placche è un gruppo di polipeptidi, denominati $A\beta$. Di questo peptide furono osservate due forme principali, dove il peptide predominante possiede 40 aminoacidi e il peptide meno rappresentato ne possiede 42. Nei pazienti affetti da Alzheimer la deposizione di amiloide ha inizio con il peptide $A\beta_{42}$, mentre $A\beta_{40}$ si accumula successivamente (Kandel et al. 2019).

I peptidi a catena corta si formano per scissione di una proteina precursore; ricerche hanno dimostrato che tale precursore è la proteina precursore dell'amiloide (*Amyloid precursor protein*, APP) che si ipotizza si trovi nella membrana cellulare dei dendriti, nei corpi cellulari, negli assoni, ma anche in altre cellule non nervose. Nonostante numerosi studi, resta poco chiara la funzione di APP. (Kandel et al. 2019). L'APP viene normalmente degradata per l'azione di una serie di enzimi, chiamate *secretasi*, che tagliano la proteina in specifiche sequenze, sotto il controllo delle preseneline 1 e 2. (Hunter e Brayne, 2018). Nel dettaglio la via di processamento dell'APP non neurotossica è la seguente: APP avente la C-terminale (*carbossi-terminale*) interno e la N-terminale (*ammino-terminale*) extracellulare, viene rimossa dall' α -secretasi, che forma a sua volta due peptidi, un peptide di 83 aminoacidi inserito nella membrana, e un peptide solubile, α -APP,

all'esterno. Il peptide di 83 amminoacidi viene ulteriormente clivato dall'enzima γ -secretasi e forma due peptidi più piccoli, ovvero p7 e p3. Tali peptidi non sono neurotossici (Hardy e Higgins, 1992). Ciò che accade in questa malattia, come detto, è un processamento alterato dell'APP, che produce peptidi neurotossici formando le placche di amiloidi. Questa via coinvolge la β -secretasi che si avvale del clivaggio della parte di APP extracellulare producendo un frammento solubile noto come β -APP e un ulteriore peptide di 91 amminoacidi, il quale viene ulteriormente clivato da γ -secretasi all'interno della membrana che dà come prodotto frammenti di 40, 42, 43 amminoacidi. Di questi, quello da 42 amminoacidi è amiloidogenico (Hardy e Higgins, 1992). La produzione e la liberazione del peptide beta-amiloide sono eventi normali nel nostro cervello: una quantità di beta amiloide è ammessa nel nostro corpo, questa dà origine a delle forme proteiche importanti per il normale funzionamento neuronale. Ad esempio i peptidi A β non neurotossici possiedono proprietà antiossidanti, regolano il trasporto di colesterolo, sono implicati nei processi di riparazione dei vasi ematici, etc. (Zhang S., Wang, Cai, Zhang M., Wu, Zhang J., Song, 2017). In tale patologia il problema è l'eccessiva formazione o una rimozione deficitaria di peptidi neurotossici. (Hunter e Brayne, 2018). L'angiopatia amiloidea è determinata dall'accumulo di β -amiloide nell'ambiente extracellulare, il quale si agglomera a livello del soma formando gli oligomeri che vanno ad interferire a livello sinaptico e con la funzionalità neuronale (Mutani et al., 2011). Le placche amiloidi in quanto agenti patogeni vengono riconosciute dal sistema immunitario che si attiva e dà l'avvio ad un'inflammatione che, se eccessiva, favorisce la neurodegenerazione. La risposta infiammatoria provoca l'attivazione della microglia e degli astrociti, a cui segue il rilascio di mediatori chimici neurotossici, tra cui citochine e radicali liberi (Cameron e Landreth, 2010) Ciò innesca una risposta nucleare per cui il neurone promuove un'attivazione di molte proteinchinasi che a loro volta fosforilano in maniera eccessiva la proteina tau. Quest'ultima, eccessivamente fosforilata, si stacca dai microtubuli creando grovigli neurofibrillari e portando così alla morte del neurone (Cameron e Landreth, 2010).

Si ritiene che l'eziologia della malattia sia una complessa interazione tra geni, fattori ambientali e stile di vita (Tachibana, Liu, Shinohara, Aikawa, e Weyer, 2019). Essendo l'eredità della malattia di Alzheimer ad insorgenza tardiva stimata intorno al 74%, è stato studiato il ruolo di un'altra proteina, l'ApoE, che sembrerebbe aggravare l'accumulo cerebrale e la successiva deposizione di peptidi amiloide- β , in particolare è coinvolto l'allele ϵ 4 dell'Apolipoprotein (Tachibana et al., 2019). L'allele ApoE4 è raro nella popolazione generale (Kandel et al., 2019). La proteina ApoE è coinvolta nel trasporto del colesterolo, nel mantenimento delle guaine mieliniche e nella stabilità delle membrane cellulari in situazioni normali, è in grado di gestire il processo appena descritto della beta-amiloide (Kandel et al., 2019).