

PROPONENTE: *Giuseppe Lembo*

TITOLO: *Caratterizzazione dei meccanismi molecolari del decadimento cognitivo riconducibile alla malattia di Alzheimer nell'ipertensione arteriosa.*

RAZIONALE E SCOPI DELLA RICERCA

L'ipertensione arteriosa è uno dei maggiori fattori di rischio per eventi cardiovascolari e cerebrovascolari acuti. Nelle fasi iniziali della patologia ipertensiva, la maggior parte dei pazienti non riferisce alcuna sintomatologia. Tuttavia, i disturbi provocati dall'ipertensione gravano in maniera importante su organi vitali quali cuore, retina, vasi arteriosi, rene e sistema nervoso centrale (SNC). L'identificazione precoce di lesioni in questi organi permette di stimare la durata del periodo di esposizione ad elevati livelli di pressione arteriosa e di fare una prognosi a lungo termine. Allo stato attuale sono già ben definite alcune lesioni precliniche per la maggior parte degli organi bersaglio dell'ipertensione arteriosa: ipertrofia ventricolare sinistra per il cuore, microalbuminuria per il rene, anomalie nel fundus oculare. Al contrario, le lesioni precliniche cerebrali associate all'ipertensione, sono molto meno caratterizzate. Tuttavia è possibile identificare almeno un duplice meccanismo attraverso il quale l'ipertensione arteriosa può determinare danni a livello cerebrovascolare: da un lato può provocare lesioni vascolari macroscopiche, quali infarti o emorragie cerebrali, ma dall'altro può contribuire anche allo sviluppo di lesioni vascolari microscopiche. Più nel dettaglio, il danno cerebrovascolare associato a ipertensione cronica è stato attribuito principalmente a meccanismi ipossici/ischemici. Questi, a loro volta, possono essere causati dai potenti effetti che l'ipertensione esercita sul circolo cerebrale, tra i quali si possono ricordare: l'ipertrofia e il rimodellamento vascolare; l'aterosclerosi; l'aumento nel tono costrittore delle arterie. Nel complesso questi eventi alterano i meccanismi di autoregolazione del flusso cerebrale, portando a una riduzione della perfusione cerebrale e determinando, di conseguenza, una diminuzione dell'apporto di ossigeno e di substrati energetici, fondamentali per le normali attività cerebrali. L'ipoperfusione cerebrale indotta dall'ipertensione, inoltre, può causare danni al normale funzionamento della Barriera Emato-Encefalica (BEE) e dell'unità neurovascolare il cui principale

compito è il mantenimento dell'omeostasi cerebrale, il controllo delle funzioni di trasporto della BEE e la regolazione del flusso cerebrale locale. Alla luce di queste considerazioni, l'ipertensione arteriosa, che fino a pochi anni orsono era ritenuta un fattore di rischio soltanto per forme di demenza vascolare, è adesso considerata uno dei fattori di rischio più influenti per la demenza di tipo Alzheimer che, com'è noto, è di gran lunga la forma prevalente di decadimento cognitivo negli ultrasessantenni.

Il progetto di ricerca che s'intende proporre sarà volto alla caratterizzazione della risposta del SNC all'ipertensione arteriosa, intesa come fattore di rischio per la malattia di Alzheimer (AD), per mirare a strategie terapeutiche atte a prevenire questa forma di demenza così insidiosa e diffusa. La comprensione dei meccanismi eziopatogenetici nell'associazione tra l'ipertensione arteriosa e demenza potrebbe aprire la strada a nuove prospettive, sia per quanto concerne l'identificazione di interventi preventivi, sia curativi.

Si possono distinguere due forme della malattia di AD: una a esordio precoce (o AD genetico) e una a esordio tardivo, detta anche AD sporadico. La prima riguarda solo una piccola percentuale dei casi totali ed è associata alla presenza di mutazioni genetiche responsabili di un'aumentata produzione del peptide neurotossico della β -amiloide ($A\beta$): tra queste ricordiamo le più comuni nel gene della Proteina Precursore dell'Amiloide (APP) e nei geni che codificano per le Preseniline 1 e 2 (PS-1 e PS-2). La seconda invece colpisce la maggior parte dei pazienti e, in questo caso, la deposizione di peptidi di $A\beta$ nel cervello non è associata a un'aumentata produzione ma, piuttosto, a un'alterata clearance di quelli prodotti dal normale metabolismo neuronale. Questo fenomeno può essere associato a un'alterazione dell'equilibrio tra l'efflusso di peptidi dal SNC al circolo periferico e l'ingresso di peptidi attraverso il percorso inverso. Gli eventi più importanti che possono minacciare il funzionamento fisiologico di questo sistema cruciale sono i cambiamenti patologici nella componente vascolare cerebrale. Inoltre, molti studi epidemiologici hanno messo in luce il contributo del danno cerebrovascolare e della disfunzione neurovascolare alla patologia di AD, evidenziando una forte associazione tra quest'ultima ed i fattori di rischio cardiovascolari

(Iadecola, 2008). E' attualmente ampiamente accettato che cambiamenti nell'unità neurovascolare, degenerazione dei capillari cerebrali, riduzione del flusso cerebrale, possano essere i primi segni di una condizione patologica che precede i cambiamenti neuronali e la neurodegenerazione.

Le alterazioni della BEE possono essere meccanismi patogenetici molto precoci, dovuti ad esempio a rotture all'interno della BEE stessa, che possono portare all'infiltrazione di cellule del sistema immunitario e di molecole tossiche, provocando una risposta infiammatoria o altre reazioni avverse nel parenchima cerebrale (Zlockovic, 2008). Infatti, è stato dimostrato che la A β è tossica per le cellule endoteliali, ed è ancora poco chiaro come tali cellule, nei vasi cerebrali, possano cambiare funzioni e proprietà con l'avanzare dell'età e del danno associato all'ipertensione. Tutti questi fattori possono avere un forte impatto sulla funzione vascolare. A un livello più fine e più molecolare, possiamo citare la presenza di trasportatori nei vasi che hanno un ruolo chiave nel proteggere il cervello e mantenere la sua omeostasi. Molti meccanismi possono contribuire al fisiologico processo di influsso/efflusso di A β in e dal parenchima cerebrale. In particolare, esistono recettori specializzati, presenti nella BEE, che trasportano la A β attraverso l'endotelio cerebrale, dal SNC nel circolo sanguigno e viceversa. I più importanti sono il recettore per i prodotti di glicosilazione Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE), che lega la A β nel sangue e la trasporta nel cervello, e il recettore LRP-1, che, compiendo il processo inverso, è fondamentale per la clearance di A β dal cervello.

Gli studi compiuti fino ad oggi sull'AD fanno emergere una chiara necessità di stimolare la ricerca e lo sviluppo di nuovi approcci che permettano l'identificazione dei meccanismi molecolari associati a processi neurodegenerativi precoci sia nell'uomo sia nei modelli animali.

Il nostro gruppo si propone di utilizzare modelli animali di ipertensione, i quali mostrano, conseguentemente all'innalzamento dei livelli pressori, un accumulo di aggregati di amiloide, ed altri tipici tratti dell'AD come la comparsa di una risposta neuroinfiammatoria e di una disfunzione della BEE. Inoltre, dati preliminari mostrano, nel nostro modello, un deterioramento nei processi di apprendimento e nella memoria.

Pertanto, tale modello animale appare un'opportunità unica per dissezionare i meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo dell'AD e correlati all'ipertensione arteriosa.

Allo scopo di individuare il meccanismo molecolare responsabile della comparsa dell'AD associato ad ipertensione, la nostra ipotesi è che il recettore RAGE potrebbe, una volta attivato da elevati livelli di pressione, sostenere la deposizione di A β , la neuroinfiammazione, la disfunzione endoteliale e l'eventuale declino cognitivo, tutti tipici tratti dell'AD.

In supporto a tale ipotesi, molte pubblicazioni mettono in luce il ruolo chiave di RAGE nella patologia vascolare (Yan, 2010), come del resto numerosi dati associano RAGE alla patologia di AD (Donahue, 2006). Pertanto in questo progetto ci proponiamo di investigare il ruolo di RAGE inteso come link molecolare tra ipertensione ed AD.

Numerose evidenze suggeriscono che forme solubili di questo recettore (sRAGE), note per agire come "esca" molecolare per i ligandi del recettore (quali ad esempio la A β) ed impedirne quindi il legame, rappresentano una promettente strategia farmacologica contro i disordini RAGE - mediati (Emanuele, 2005). Pertanto, si può ipotizzare che in un modello nel quale i livelli di sRAGE sono elevati, si potrebbe limitare lo sviluppo dell'AD riducendo il trasporto di amiloide nel cervello, mettendo in luce in questo modo, la possibilità di un nuovo intervento per tale patologia. Per tale ragione crediamo che la nuova strategia di ricerca proposta in questo progetto sarà utile per comprendere in che modo RAGE potrebbe mediare l'AD indotto da ipertensione. L'opportunità di utilizzare modelli animali di ipertensione in combinazione con modelli animali geneticamente modificati per RAGE (generati dalla Dr.ssa Shi Du Yan, Columbia University, New York) potrà essere una nuova strada per investigare il contributo vascolare nell'ambito dei meccanismi fisiopatologici dell' AD.

CRONO PROGRAMMA DI ESECUZIONE DEL PROGETTO:

In questo studio ci proponiamo:

1. Di investigare in che modo l'ipertensione scatena la comparsa dell'AD attraverso un meccanismo dipendente da RAGE.

2. Di esplorare il ruolo di RAGE nella risposta neuroinfiammatoria associata con la patologia di AD indotta da ipertensione.
3. Di delineare un metodo per la valutazione di forme solubili circolanti del recettore RAGE (sRAGE). Tale approccio sarà prima messo a punto nei topi ipertesi, correlando i livelli di sRAGE con la progressione del deterioramento cognitivo, ed in seguito traslato in pazienti ipertesi, come nuovo marcatore biologico dell'AD.

Questo progetto di ricerca si focalizza sull'identificazione dei meccanismi molecolari attraverso i quali l'ipertensione arteriosa causa la patologia AD.

La patologia di AD è stata considerata per molto tempo di origine non vascolare, anche se gran parte degli studi descrivono che il rischio cardiovascolare, come l'ipertensione, aumenta l'incidenza della malattia. A questo proposito, abbiamo recentemente riportato che due differenti modelli murini di ipertensione, uno indotto farmacologicamente tramite Angiotensina II (AngII) e uno indotto meccanicamente tramite coartazione aortica trasversa (TAC), sviluppano una patologia caratterizzata dalla presenza di alterazioni riconducibili alla malattia di AD, quali la formazione di aggregati beta foglietto nel parenchima cerebrale e negli spazi perivascolari (Gentile, 2009), e neuroinfiammazione acuta (Poulet, 2006) e cronica (Carnevale, 2010). Inoltre, risultati preliminari, mostrano che, condizioni croniche di ipertensione, indotta nei modelli suddetti, determinano anche l'insorgenza di un deterioramento delle funzioni cognitive, tipicamente associato all'AD.

Obiettivo 1:

Come primo scopo del nostro studio investigheremo il ruolo meccanicistico dell'ipertensione nell'insorgenza della patologia di AD, attraverso un meccanismo RAGE dipendente. Questa ipotesi nasce dalla considerazione che RAGE è espresso dalle cellule endoteliali e che molti fattori neuro-ormonali possono aumentarne l'espressione. D'altra parte, RAGE può essere attivato a valle dello stress ossidativo (Ihara, 2007) e la produzione di ROS indotta dall'iperglicemia aumenta la sua espressione (Yao, 2009). Allo stato attuale delle conoscenze, non esistono ancora studi definitivi che correlano lo stress emodinamico a RAGE. Tuttavia, l'aumento della pressione sanguigna è uno

dei maggiori stimoli per la produzione di ROS e questo potrebbe reclutare l'attivazione di RAGE. A tale proposito, abbiamo recentemente dimostrato che elevati livelli di pressione intravascolare sono responsabili della produzione di ROS e della disfunzione vascolare (Vecchione, 2009), facendoci ipotizzare che questo possa essere la causa della attivazione di RAGE nei vasi cerebrali. Poiché RAGE agisce come trasportatore di peptidi di A β / β -foglietti dal torrente circolatorio al parenchima cerebrale, l'aumento di pressione sanguigna, reclutando RAGE, potrebbe rappresentare un importante fattore causale nell'eziologia della patologia. A supporto di tale ipotesi possiamo citare dati preliminari che mostrano come l'ipertensione induca precocemente l'espressione di RAGE nei vasi cerebrali. Pertanto, per valutare il coinvolgimento di RAGE nella patologia di AD indotta dall'ipertensione, andremo a dissezionare i possibili meccanismi coinvolti nell'attivazione del recettore nei modelli di ipertensione descritti in precedenza. A questo scopo, ci focalizzeremo sulla formazione dei prodotti di glicazione, Advanced Glycation End-products (AGEs) e dello stress ossidativo indotto da elevati livelli di pressione. Infine, per validare la nostra ipotesi, indurremo l'ipertensione in topi geneticamente modificati, caratterizzati dalla globale ablazione di RAGE, per valutarne la deposizione di amiloide e il deficit cognitivo. Per entrare ulteriormente nel meccanismo molecolare attraverso cui RAGE determina lo sviluppo della patologia di AD, investigheremo il contributo del sistema vascolare, riproducendo gli stessi modelli di ipertensione in due ulteriori topi transgenici: uno esprime selettivamente nelle cellule endoteliali una forma mutata di RAGE mancante del dominio citoplasmatico, responsabile della trasduzione del segnale a valle del recettore (DN-PPET) ed un altro con una ablazione selettivamente endoteliale del recettore (RAGE KO endoteliale).

Obiettivo 2:

L'attivazione di processi infiammatori e della risposta immune innata è stata osservata sia nel cervello di pazienti deceduti di malattia di AD sia in modelli animali della patologia. Nel corso degli anni si è dibattuto molto se questi processi infiammatori, sostenuti quasi esclusivamente da cellule residenti (microglia e astrociti), possano guidare la patologia o essere il risultato del

processo patologico stesso. Inoltre, anche il danno da ipertensione nei vari organi bersaglio è stato da sempre associato all'instaurarsi di processi infiammatori. Nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato che l'ipertensione indotta dal TAC evoca astrogliosi, produzione di citochine infiammatorie e incremento della permeabilità della BEE nella corteccia e nell'ippocampo (Poulet, 2006). Più recentemente abbiamo caratterizzato il ruolo della neuroinfiammazione nella patologia di AD indotta dai nostri modelli di ipertensione (Carnevale, 2010), trovando che l'ipertensione da sola è capace di attivare processi neuroinfiammatori già in una fase precedente ai sintomi patologici tipici di AD e che promuoverne l'attivazione durante il corso della patologia (stimolando il sistema immunitario), può essere una strategia protettiva su alcune alterazioni quali ad esempio la deposizione di A β . In questo progetto, studieremo come si colloca l'attivazione del recettore RAGE in questi fenomeni precedentemente descritti. Infatti, un altro ruolo importante di questo recettore è il suo coinvolgimento nelle risposte infiammatorie. E' stato ampiamente descritto come la sua attivazione sia capace di sostenere cronicamente processi infiammatori, attraverso l'induzione di citochine pro-infiammatorie, stress ossidativo etc. Pertanto si può ipotizzare che il reclutamento di RAGE indotto dall'ipertensione possa attivare una complessità di processi che contribuiscono globalmente a regolare vari aspetti della patologia di AD. A tale scopo, ci proponiamo di studiare la risposta neuro infiammatoria nei topi geneticamente modificati per RAGE, descritti in precedenza.

Obiettivo 3

L'ultimo obiettivo dello studio prevede la messa a punto di un sistema per la valutazione di forme solubili circolanti del recettore RAGE (sRAGE), che agiscono come "esca" molecolare per i ligandi del recettore. In questo modo, essi impediscono il legame di peptidi tossici quali la A β , proteggendo così dall'attivazione dei meccanismi di segnalazione indotti da RAGE, nonché dal trasporto stesso di tali peptidi attraverso la cellula endoteliale. Infatti, RAGE possiede un metabolismo molecolare che porta alla formazione di forme solubili del recettore, generate da meccanismi distinti. In particolare è stato riportato che tramite taglio si produce una forma circolante sRAGE, capace di legare peptidi, agendo come un recettore-richiamo. La misurazione di sRAGE nel plasma o nel

siero attraverso specifici ELISA, ci permetterà di associare i livelli di RAGE solubile allo stato di avanzamento della patologia. Tale approccio sarà prima messo a punto nei nostri modelli murini di ipertensione, nei quali sono stati riscontrati tratti tipici della malattia di Alzheimer, correlando i livelli di sRAGE con la progressione del deterioramento cognitivo. In seguito, tale approccio sarà traslato in pazienti ipertesi, valutandone l'attendibilità come nuovo marcatore biologico dell'AD.

Strategia di sviluppo sperimentale:

1. Investigare come l'ipertensione porta alla comparsa della malattia di AD attraverso un meccanismo dipendente da RAGE. I nostri dati preliminari indicano che l'ipertensione è capace di reclutare precocemente RAGE (8 ore dall'induzione di ipertensione attraverso TAC) nei vasi cerebrali, supportando la nostra ipotesi che RAGE possa essere il bersaglio molecolare indotto dall'ipertensione e capace di determinare le alterazioni patologiche tipiche dell'AD. A questo scopo, studieremo un modello murino di ipertensione, indotta chirurgicamente mediante coartazione dell'arco aortico trasverso (TAC), tra la carotide sinistra e il tronco anonimo. Tale modello animale risulta particolarmente adatto per lo studio dei fenomeni patologici e per la ricerca dei meccanismi suddetti in quanto abbiamo precedentemente descritto che l'ipertensione indotta da TAC determina la comparsa di segni tipici dell'AD in tempi relativamente brevi. In particolare, abbiamo dimostrato che l'ipertensione indotta da TAC provoca la comparsa di depositi di A β , visibili nel parenchima cerebrale e intorno ai vasi già dopo quattro settimane, in regioni cerebrali tipicamente colpite dalla malattia di AD (Poulet et al, 2006; Gentile et al, 2009). Inoltre, abbiamo recentemente dimostrato che allo stesso tempo, i topi soggetti a TAC mostrano dei chiari deficit in alcuni test comportamentali, validati per l'individuazione di alterazioni ippocampali tipiche dell'Alzheimer (apprendimento e memoria).

Nell'ambito di questo progetto, quindi, il ruolo del recettore verrà studiato in animali sottoposti ad ipertensione mediante TAC utilizzando tecniche di biologia molecolare (analisi di espressione genica mediante real time PCR; analisi della proteina mediante tecniche di western blotting e immunostochimica) e, una volta definito il coinvolgimento di questo recettore nel danno cerebrale

indotto da ipertensione, ne studieremo il ruolo realizzando lo stesso modello di ipertensione (TAC) su animali geneticamente modificati per l'assenza di questo recettore (topi RAGE KO).

Come illustrato nel razionale dello scopo, sulla base dei nostri risultati ottenuti in vasi isolati, nei quali uno stimolo con elevati livelli di pressione si traduce un aumento dello stress ossidativo, ipotizziamo che questo meccanismo possa essere responsabile della formazione degli AGEs e della conseguente attivazione del recettore RAGE ligando - mediata. A tale proposito, possiamo citare dati preliminari indicanti un aumento dei livelli di AGEs in campioni di siero di animali ipertesi con un picco a 4 ore dall'induzione dell'ipertensione. Per investigare tale scopo, utilizzeremo due approcci: 1) un inibitore della formazione degli AGEs (Amminoguanidina), 2) un antiossidante (Tiron o Tempol), entrambi somministrati prima dell'induzione dell'ipertensione, per verificare gli effetti sull'espressione precoce di RAGE nei vasi cerebrali. Infine, per confermare la nostra ipotesi del ruolo meccanicistico di RAGE nell'AD indotto da ipertensione, indurremo lo stato ipertensivo anche in topi con ablazione globale del recettore RAGE, per valutare lo sviluppo della patologia in termini di deposizione di A β e declino cognitivo.

L'ultimo aspetto che tratteremo sarà dissezionare lo specifico contributo del sistema vascolare nell'AD indotto da ipertensione, utilizzando in questo caso topi con ablazione selettiva di RAGE nelle cellule endoteliali.

2. Esplorare il ruolo della neuroinfiammazione in relazione all'AD indotto da ipertensione e il contributo di RAGE in tale aspetto. Recentemente abbiamo esplorato il ruolo della neuroinfiammazione nel nostro modello di AD indotto da ipertensione. Poiché molti lavori dimostrano un chiaro coinvolgimento di RAGE nei processi infiammatori, ulteriore scopo di questo progetto sarà quello di dissezionare il contributo dell'attivazione di questo recettore da parte degli elevati livelli di pressione, sui processi neuroinfiammatori che si accompagnano alle alterazioni patologiche del nostro modello. Quindi, per sostenere l'ipotesi che RAGE possa essere la chiave molecolare della regolazione dei multipli aspetti dell'AD, valuteremo i processi neuroinfiammatori nei modelli geneticamente modificati per il recettore RAGE e sottoposti ad ipertensione. In

particolare valuteremo i cambiamenti della microglia, in associazione alla comparsa di aggregati amiloidei, ed il profilo di espressione di citochine pro- ed anti-infiammatorie tramite RT-PCR ed ELISA.

3. Tracciare l'attivazione del pathway di RAGE nel nostro modello animale di ipertensione che induce spontaneamente AD. L'ultimo obiettivo che ci proponiamo di affrontare sarà valutare l'attivazione di RAGE in topi ipertesi che sviluppano AD. I RAGE solubili (sRAGE) circolanti, risultanti dal taglio della proteina totale transmembrana, agiscono come recettori "esca" e risultano in grado di legare i vari ligandi del recettore. Pertanto misureremo i livelli di sRAGE e AGEs nel plasma o nel siero di animali ipertesi attraverso specifici ELISA. In tal modo potremmo correlare i livelli di sRAGE/AGEs allo sviluppo/progressione della malattia di Alzheimer nel nostro modello animale di ipertensione.

I risultati raggiunti in quest'ultimo obiettivo, ci permetteranno di traslarli rapidamente all'uomo, valutando l'attivazione di RAGE anche in pazienti ipertesi. A questo scopo collaboreremo con l'Unità per la valutazione dell'AD presente nel nostro Istituto (UVA Unit). Quest'ultimo aspetto appare di fondamentale importanza poiché potrebbe porre le basi per un nuovo approccio terapeutico per l'AD su base vascolare. Molti studi clinici, infatti, stanno testando piccole molecole antagoniste all'attivazione di RAGE, utilizzandole come strategie anti-RAGE.

Trasferibilità dei risultati.

Tale progetto propone nuovi approcci volti a dissezionare la correlazione di due malattie molto diffuse, l'ipertensione e l'AD. I meccanismi coinvolti in tale correlazione rimangono tutt'ora inesplorati. A tal proposito, studi implicati in questo ambito risulterebbero necessari. La nuova strategia descritta in questo progetto si propone di partire da modelli vascolari sperimentali che spontaneamente presentano alterazioni patologiche tipiche dell'AD. Il risultato del nostro studio potrà aumentare la conoscenza dei meccanismi fisiopatologici e molecolari che correlano l'ipertensione arteriosa all'AD, prefiggendosi come traguardo l'identificazione di nuovi target molecolari per la prevenzione e il trattamento del declino cognitivo. Concludendo, il dosaggio dei

sRAGE in pazienti ipertesi potrebbe essere considerato un nuovo biomarker della progressione della malattia ed eventualmente un nuovo disegno di trial clinico in cui l'incremento dei sRAGE in fasi precoci della malattia, potrebbe divenire una strategia protettiva.

Metodologia:

Modello di ipertensione: Topi anestetizzati con xylazina/ketamina saranno sottoposti a coartazione dell'arco aortico (TAC), effettuata tra il tronco anonimo e la carotide sinistra attraverso una legatura dell'aorta. Allo stesso modo saranno trattati i topi di controllo (sham) che subiranno la stessa procedura chirurgica ma senza induzione di stenosi. Il gradiente trans-stenotico verrà misurato mediante tecniche ultrasonografiche (Vevo 770, Visualsonics inc., Canada), posizionando la sonda a livello della coartazione. Un altro gruppo di animali sarà trattato con Angiotensina II o veicolo tramite pompe osmotiche impiantate sottocute. La pressione sanguigna sarà misurata tramite sistema tail-cuff. I topi geneticamente modificati (RAGE KO e DN-PPET) saranno generati dalla Dr. Yan.

Fenotipo comportamentale: L'apparato water-maze (EthoVision, Noldus Information Technology) consiste in una piscina nera circolare con acqua a 26°C. All'interno sarà posizionata una piattaforma trasparente a 10 cm dal bordo della piscina. I topi saranno trasferiti dalle gabbie alla piscina e sarà testata l'abilità nell'identificare la piattaforma durante una fase iniziale che precede la fase di acquisizione. Ogni giorno i topi dovranno effettuare 3 trials durante i quali dovranno nuotare per 60s fino a raggiungere la piattaforma. Il raggiungimento della piattaforma sarà definito come permanenza su di essa per 3s. Durante la fase di acquisizione, i topi che non avranno raggiunto la piattaforma saranno addestrati posizionandoli sulla piattaforma per 10s alla fine del trial. Un'ora dopo l'ultimo test, la piattaforma verrà rimossa dalla piscina e ogni topo sarà sottoposto ad un esame per il mantenimento della memoria in test di 30s; il tempo trascorso nel quadrante bersaglio del maze sarà calcolato come misura del mantenimento della memoria.

Cambiamenti fisiopatologici cerebrali: L'immunoistochimica sarà effettuata su sezioni free-floating fissate in paraformaldeide. L'incubazione con anticorpi primari a differenti concentrazioni sarà

seguita da specifici anticorpi secondari legati a diversi fluorocromi; i campioni saranno esaminati con un microscopio a fluorescenza (Leica, DM4000B). Le analisi istologiche per marcare gli aggregati di amiloide utilizzeranno in specifico la colorazione del Congo Red e la Tioflavina S. Saranno effettuate marcature con un anticorpo anti-PECAM-1 (marker di cellule endoteliali) per la localizzazione vascolare accoppiata alla marcatura con GLUT-1 (trasportatore endoteliale del glucosio). Verrà utilizzato un anticorpo anti-RAGE. Per la rilevazione della microglia saranno impiegati anticorpi anti-Iba-1 (marker citoplasmatico), anti-CD68 (marker lisosomiale) e anti-CD11b (marker di superficie). Per determinare l'eventuale comparsa di neurodegenerazione utilizzeremo anticorpi che riconoscono la Sinaptofisina, MAP-2 e GAP-43 e un anticorpo anti-Caspase-3 per valutare la morte cellulare. I livelli di differenti molecole di interesse saranno misurati in estratti di tessuto cerebrale avvalendosi di Real-Time PCR e kit ELISA.

Risultati preliminari:

1. Il test di apprendimento e memoria in topi ipertesi mostra un breve periodo di latenza per il raggiungimento della piattaforma in sham comparati con topi TAC di 4 settimane. Nel test del quadrante i topi TAC trascorrono meno tempo rispetto ai topi sham nel quadrante dove è localizzata la piattaforma (Figura 1).

2. L'ipertensione porta ad una precoce attivazione (TAC 8 ore) di RAGE resa evidente dai livelli di mRNA e di proteine e dalla localizzazione in vasi cerebrali, come mostrato nella doppia marcatura RAGE/PECAM-1 (Figura 2).

3. L'ipertensione innesca la formazione di AGEs nel sangue prima dell'up-regolazione di RAGE nelle cellule endoteliali del cervello, come mostrato dai livelli misurati a tempi precoci dopo TAC tramite kit ELISA (Figura 3).

Figure 1

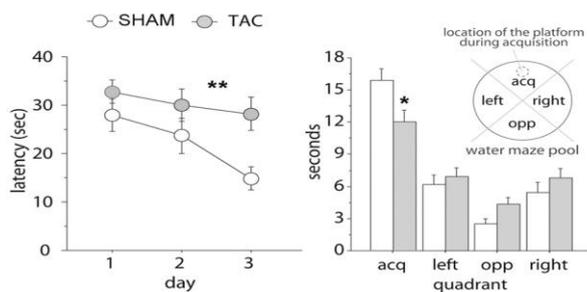


Figure 2

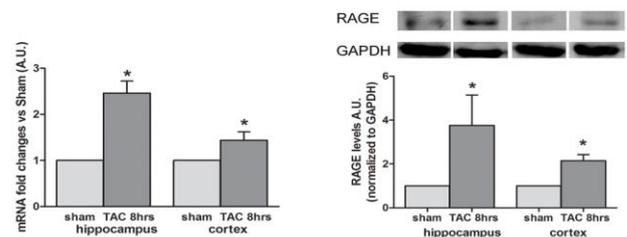
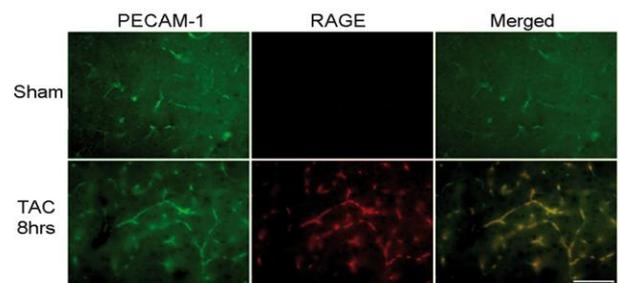
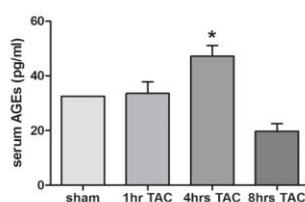


Figure 3



ATTREZZATURE:

Il laboratorio nel quale si svolgerà il progetto di ricerca proposto consiste nelle seguenti attrezzature:

1. Camera chirurgica provvista di due microscopi operatori (SMZ800, Nikon, Japan) e un respiratore (Basile, Milano, Italia).
2. Camera per analisi ad ultrasuoni per Doppler sia aortico che cerebrale, fornito del miglior sonografo attualmente disponibile per piccoli animali (Vevo 770, Visualsonics Inc., Canada).
3. Le attrezzature provviste per la fenotipizzazione di una grande varietà di comportamento dei topi, includono il Morris water maze, apparati di condizionamento alla paura, plus-maze, registratore video provvisto di video-camera per luce rossa e bianca, computer con software specifico per l'analisi comportamentale (es., Observer and EthoVision by Noldus, The Netherlands).
4. Attrezzatura provvista di strumentazione per la misurazione della pressione sanguigna: un sistema tail-cuff (Visitech Systems, Apex, NC, USA) che permette la valutazione della pressione con tecnica non invasiva in topi coscienti.
5. Un laboratorio di biologia molecolare fornito di attrezzature per l'analisi di proteine e mRNA, microcentrifughe (Eppendorf) e ultracentrifughe (Beckman Coulter Optima max) per l'estrazione di metaboliti da tessuto. Sistemi completi per l'analisi proteica consistenti in elettroforesi e western blotting (Biorad) e un sistema di rilevazione (ChemiDoc, Biorad). La Real-Time PCR per l'analisi dell'espressione di mRNA è stata fornita dalla Applied Biosystem. Il laboratorio è equipaggiato anche di un lettore multimodale di piastre per chemiluminescenza, assorbanza e fluorescenza (Mithras LB940).
6. Un laboratorio di istologia per effettuare analisi istologiche e di immunoistochimica su sezioni tagliate al criostato (CM1900, Leica, Germania) e successivamente analizzate con microscopio a fluorescenza (DM4000B, Leica, Germania), provvisto di videocamera e

software (LAS Suite). Anche un microscopio confocale Ultraview è disponibile in tale laboratorio (PerkinElmer).

Bibliografia

Carnevale D, Mascio G, Ajmone-Cat MA, D'Andrea I, Cifelli G, Madonna M, Cocozza G, Frati A, Carullo P, Carnevale L, Alleva E, Branchi I, Lembo G, Minghetti L. Role of neuroinflammation in hypertension-induced brain amyloid pathology. *Neurobiol Aging*. 2010 Oct 18.

Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan JA 3rd, Silverberg GD, Miller MC, Tavares R, Yang W, Wu Q, Sabo E, Hovanesian V, Stopa EG. RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2006 112:405-15.

Emanuele E, D'Angelo A, Tomaino C, Binetti G, Ghidoni R, Politi P, Bernardi L, Maletta R, Bruni AC, Geroldi D. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol*. 2005 62:1734-6.

Gentile MT, Poulet R, Di Pardo A, Cifelli G, Maffei A, Vecchione C, Passarelli F, Landolfi A, Carullo P, Lembo G. Beta-amyloid deposition in brain is enhanced in mouse models of arterial hypertension. *Neurobiol Aging*. 2009 Feb;30(2):222-8.

Iadecola, C., Davisson, R.L., 2008. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab*. 7, 476–484.

Ihara Y, Egashira K, Nakano K, Ohtani K, Kubo M, Koga J, Iwai M, Horiuchi M, Gang Z, Yamagishi S, Sunagawa K. Upregulation of the ligand-RAGE pathway via the angiotensin II type I receptor is essential in the pathogenesis of diabetic atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Oct;43(4):455-64. Epub 2007 Jul 21.

Poulet R, Gentile MT, Vecchione C, Distaso M, Aretini A, Fratta L, Russo G, Echart C, Maffei A, De Simoni MG, Lembo G. Acute hypertension induces oxidative stress in brain tissues. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 Feb;26(2):253-62.

Vecchione C, Carnevale D, Di Pardo A, Gentile MT, Damato A, Coccozza G, Antenucci G, Mascio G, Bettarini U, Landolfi A, Iorio L, Maffei A, Lembo G. Pressure-induced vascular oxidative stress is mediated through activation of integrin-linked kinase 1/betaPIX/Rac-1 pathway. *Hypertension*. 2009 Nov;54(5):1028-34.

Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE Axis: A Fundamental Mechanism Signaling Danger to the Vulnerable Vasculature. *Circ Res*. 2010 106:842-53.

Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes*. 2010 59:249-55.

Zlokovic B.V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008 57, 178-201.

Budget richiesto

Le spese relative al progetto saranno così suddivise:

1. materiale di consumo per un ammontare di € 13.000/anno

Totale richiesto: € 26.000

2. compensi a personale per 1 tecnico di laboratorio € 12.000/anno

Totale richiesto: € 24.000