

## LA VIA DI WNT E LE DEMENZE

**Valeria Bruno**

I. N. M. Neuromed, Pozzilli

Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, "Sapienza" Università di Roma

Evidenze derivanti dalla genetica umana e dall'utilizzo di animali transgenici suggeriscono che un'aumentata produzione di peptide  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -AP) rappresenti uno degli eventi primari nella fisiopatologia della Demenza di Alzheimer.

Il  $\beta$ -AP applicato a colture neuronali induce apoptosi, un fenotipo di morte cellulare che si riscontra anche nei cervelli dei pazienti affetti da Alzheimer.

Come ciò si correla alla formazione dei grovigli neurofibrillari è ancora poco chiaro, perché, *in vitro*, i neuroni esposti al  $\beta$ -AP degenerano con una velocità tale da non consentire la formazione dei grovigli.

I grovigli neurofibrillari potrebbero svilupparsi in neuroni che *in vivo* sfuggono ad un rapido processo esecutivo di degenerazione apoptotica.

Il danno del DNA associato all'espressione di p53 potrebbe rappresentare un punto di convergenza di multiple vie intracellulari reclutate durante il processo di tossicità da  $\beta$ -AP.

Il p53 induce diversi geni che promuovono sia la riparazione del DNA che la morte apoptotica.

È quindi importante stabilire se un programma trascrizionale sotto il controllo di p53 sia coinvolto nella formazione dei grovigli neurofibrillari in cellule nervose esposte al  $\beta$ -AP.

La formazione dei grovigli neurofibrillari deriva da una iperfosforilazione della proteina tau indotta dalla GSK-3 $\beta$ , enzima sotto il controllo della via canonica di Wnt.

Le proteine Wnt costituiscono una famiglia di glicoproteine secrete, caratterizzate da numerosi residui cisteinici conservati.

Le loro funzioni sono state indagate per più di 20 anni attraverso studi genetici su *Drosophila Melanogaster*, modelli murini, *Caenorhabditis Elegans* ed analisi biochimiche su *Xenopus Laevis*, embrioni di pollo e colture di cellule di mammifero.

Evidenze recenti hanno confermato il coinvolgimento di tali proteine e di molecole associate in numerosi processi embriogenetici, fisiologici ed omeostatici ma anche in varie condizioni patologiche.

Le glicoproteine Wnt agiscono come molecole segnale in grado di attivare almeno tre vie intracellulari.

Quella più a lungo studiata è la "via canonica" o "via Wnt/ $\beta$ catenina" che interviene nella regolazione di proliferazione e sopravvivenza cellulare.

Le vie  $\beta$ catenina indipendenti sono invece rappresentate dalla "via Planar Cell Polarity (PCP)-like", coinvolta nell'organizzazione del citoscheletro e dunque di polarità e migrazione cellulare, e la "via calcio-mediata", la cui funzione non è stata ancora ben chiarita.

La capacità di queste molecole di innescare pattern alternativi di trasduzione del segnale, unitamente alla loro variabilità genetica (sono codificate da 19 geni umani), rende conto della molteplicità degli eventi a cui prendono parte.

La via canonica o Wnt/ $\beta$ catenina è attivata dalle glicoproteine Wnt che dopo aver subito all'interno della cellula processi di palmitoilazione e N-glicosilazione, necessari per la loro stabilità e conformazione, vengono secrete nell'ambiente extracellulare.

A livello della membrana plasmatica della cellula bersaglio le glicoproteine Wnt interagiscono con un complesso recettoriale costituito da un recettore a 7 domini transmembrana noto come Frizzled (FZD), del quale esistono nell'uomo 10 varianti, e dal corecettore LDL-Receptor-related Protein 5-6 (LRP5 e LRP6).

La specificità dell'interazione tra tale complesso e le singole glicoproteine Wnt è assicurata per lo più da un dominio ricco in cisteina (Cistein Rich Domain, CRD) presente sul

versante extracellulare di FZD.

L'attivazione del recettore porta all'innesco di una complessa via del segnale intracellulare caratterizzata, nelle prime fasi, dalla fosforilazione del LRP5/6 a livello della porzione citoplasmatica e dall'attivazione della proteina Dishevelled (DSH).

Questi eventi sono responsabili della successiva interazione dello stesso LRP5 con la axina, molecola facente parte di un complesso multiproteico in associazione con Adenomatous Polyposis Coli (APC) e Glicogeno Sintasi Kinasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ).

In assenza del segnale Wnt, questo complesso è responsabile della fosforilazione e della conseguente degradazione proteasomica della  $\beta$ catenina una proteina multifunzionale che agisce nel nucleo come fattore di trascrizione e a livello della membrana plasmatica come modulatore dell'adesione cellulare.

L'attivazione della via di Wnt provoca la distruzione del complesso APC/Axina/GSK-3 $\beta$  con conseguente mancata degradazione ed accumulo della  $\beta$ catenina.

Questa molecola è così in grado di traslocare nel nucleo cellulare ove, interagendo con fattori di trascrizione della famiglia dei T-Cell Factors (TCF) o dei Lymphoid Enhancer Factors (LEF), modula l'espressione di numerosi geni bersaglio.

La via Wnt/ $\beta$ catenina ha un ruolo centrale in numerosi processi embriogenetici comprendenti lo sviluppo del sistema scheletrico, della placenta, di cuore, reni, polmoni e del tratto riproduttivo.

Numerose sono le evidenze che supportano il suo ruolo anche nell'ambito del neurosviluppo.

Componenti della via "classica" intervengono infatti nel controllo della proliferazione e della differenziazione dei neuroprogenitori all'interno della corteccia, nella regolazione della maturazione assonale nel cervelletto e nello sviluppo della funzione e della plasticità sinaptiche nei neuroni ippocampali.

In particolare, la modulazione della plasticità sinaptica da parte della via di Wnt sembra derivare dall'aumentata attività della  $\beta$ catenina, che ha un ruolo fondamentale nelle interazioni cellulari, e dalla stabilizzazione dei microtubuli assonali.

È stato inoltre recentemente evidenziato come il segnale Wnt intervenga nella regolazione della neurogenesi anche nell'adulto, soprattutto a livello della zona subgranulare dell'ippocampo.

La via Wnt/ $\beta$ catenina riveste un ruolo fondamentale anche nei meccanismi di neuroprotezione, ruolo evidenziato grazie ad esperimenti condotti con il litio (LiCl), il cui effetto neuroprotettivo è stato attribuito all'inibizione dell'enzima GSK-3 $\beta$  elemento centrale di tale via cellulare.

A livello extracellulare sono presenti degli antagonisti della via di Wnt, le proteine della famiglia Dickkopf (Dkk), che antagonizzano la via Wnt/ $\beta$ catenina interagendo con il corecettore LRP5/6 e promuovendone l'endocitosi e dunque la rimozione dalla membrana plasmatica.

La famiglia Dickkopf comprende 4 membri (Dkk-1-4), di cui la proteina più studiata è Dkk-1.

Dkk-1 antagonizza il segnale Wnt formando un complesso ternario con LRP5/6 e con un altro recettore a singolo dominio transmembrana appartenente alla famiglia Kremen (Krm1/2).

Queste interazioni promuovono l'internalizzazione per endocitosi del corecettore LRP5/6. Dkk-1 sembra intervenire nella regolazione di numerosi processi cellulari, prima tra tutti la morte cellulare attraverso l'apoptosi.

Questa sua importante funzione è confermata da numerose evidenze: innanzitutto l'espressione del gene codificante per Dkk-1 è indotta dal p53, il principale sensore di danno al DNA nonché il più importante attivatore del processo apoptotico; inoltre la mutagenesi promossa da agenti come i raggi UV ed i chemioterapici provoca un aumento dell'espressione di tale gene.

È stato riportato che alterazioni nel segnale della via di Wnt sono presenti in patologie cerebrali umane, quali l'autismo, la schizofrenia e la Demenza di Alzheimer.

Infatti, evidenze recenti suggeriscono che la perdita della funzione della via di Wnt sia coinvolta nella fisiopatologia della degenerazione neuronale nella Demenza di Alzheimer.

In particolare, l'antagonista fisiologico Dkk-1 è indotto da p53 e potrebbe quindi rap-

presentare una componente della sequela di eventi che portano alla tossicità neuro-nale in risposta al  $\beta$ -AP.

L'induzione di Dkk-1 previene l'inibizione della GSK-3 $\beta$  da parte di Wnt, facilitando la fosforilazione della proteina tau e la conseguente formazione dei grovigli neurofibrillari nei neuroni che sopravvivono ad una rapida esecuzione di morte apoptotica.

Il  $\beta$ -AP determina in coltura una riduzione dei livelli di  $\beta$ -catenina ed un'induzione della proteina Dkk-1, che provoca una interferenza con il normale funzionamento della via di Wnt.

Di conseguenza, il blocco dei processi che portano alla formazione di Dkk-1 potrebbe rappresentare una nuova strategia neuroprotettiva nella patologia di Alzheimer. Infatti, la stimolazione della via di Wnt o mediante l'aggiunta delle glicoproteine Wnt alle colture o mediante il blocco della funzione di Dkk-1, induce neuroprotezione dalla tossicità indotta dal  $\beta$ -AP.

Lo stesso effetto si ottiene con il litio, inibitore dell'enzima GSK-3 $\beta$  che mima l'attivazione della via di Wnt.

La capacità del litio e della via canonica di Wnt di controllare l'attività della GSK-3 $\beta$  supporterebbero pertanto l'ipotesi che la via di Wnt rappresenti il link tra le due caratteristiche anatomo-patologiche principali della demenza di Alzheimer, le placche senili, prodotte dall'accumulo di  $\beta$ -AP (che interferirebbe con il segnale di Wnt), ed i grovigli neurofibrillari, risultanti dall'iperfosforilazione della proteina tau (un substrato della GSK-3 $\beta$ ).

Secondo l'ipotesi amiloidogena della Demenza di Alzheimer, la produzione di  $\beta$ -AP, ed il suo accumulo nelle placche senili, determinerebbe una serie di eventi che portano alla iperfosforilazione della proteina tau ed alla formazione dei grovigli neurofibrillari.

La capacità del  $\beta$ -AP di indurre l'espressione di Dkk-1 risulterebbe in un'aumentata attività della GSK-3 $\beta$  con conseguente iperfosforilazione della proteina tau.

Infatti, un'interferenza con la funzione di Dkk-1 è in grado, in colture neuronali, di frenare la formazione da parte del  $\beta$ -AP dei filamenti PHF (Paired Helical Filaments), forme di aggregazione della proteina tau iperfosforilata.

Oltre ad essere implicata nella Demenza di Alzheimer, un malfunzionamento della via di Wnt è stato anche osservato in modelli cellulari di Malattia di Huntington, dove la mutazione causa ridotti livelli di  $\beta$ -catenina ed un'alterazione della trascrizione mediata da TCF, e dove l'iperespressione della  $\beta$ -catenina risulta in protezione nei confronti della mutazione.

Tutto ciò suggerisce che approcci farmacologici mirati a modulare positivamente la via canonica di Wnt potrebbero apportare benefici nel trattamento delle patologie neurodegenerative del sistema nervoso centrale.